

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1935

THÈSE

561^{no}

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'État)

PAR

Lucien COSTIL

Né à Oran, le 1^{er} Avril 1908

LE DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE
DE LA TUBERCULOSE
PAR LA CULTURE DU BACILLE DE KOCH

Président : M. ROBERT DEBRÉ, Professeur

PARIS
LIBRIRIE E. LE FRANÇOIS
91, BOULEVARD ST-GERMAIN, 91

1935

INSTITUT DE MÉDECINE DE PARIS

THÈSE

1880

PAR M. J. B. B.

1880

PAR M. J. B. B.

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1935

THÈSE

N°

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'État)

PAR

Lucien COSTIL

Né à Oran, le 1^{er} Avril 1908

LE DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE
DE LA TUBERCULOSE
PAR LA CULTURE DU BACILLE DE KOCH

Président : M. ROBERT DEBRÉ, Professeur

PARIS
LIBRAIRIE E. LE FRANÇOIS
91, BOULEVARD ST-GERMAIN, 91

1935

I. — PROFESSEURS

	MM.
Anatomie	ROUVIÈRE.
Physiologie	Léon BINET.
Physique médicale	STROHL.
Chimie médicale	DESGREZ.
Bactériologie	Robert DEBRÉ.
Parasitologie et histoire naturelle médicale	BRUMPT.
Pathologie médicale et générale.	BAUDOUIN.
Pathologie chirurgicale	CHEVASSU.
Anatomie pathologique.	ROUSSY.
Histologie.	CHAMPY.
Pharmacologie et matière médicale.	TIFFENEAU.
Thérapeutique	HARVIER.
Hygiène et médecine préventive.	TANON.
Médecine légale	BALTHAZARD.
Histoire de la médecine et de la chirurgie.	LAIGNEL-LAVASTINE
Pathologie expérimentale et comparée.	FIESSINGER.
Hydrologie thérapeutique et climatologie.	Maurice VILLARET.
Clinique médicale.	LOEPER.
	CARNOT.
	CLERC.
	Marcel LABBÉ.
Hygiène et clinique de la première enfance.	LEREBOULLET.
Clinique des maladies des enfants	NOBÉCOURT.
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale.	H. CLAUDE.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	GOUGEROT.
Clinique des maladies du système nerveux	GUILLAIN.
Clinique des maladies infectieuses.	LEMIERRE.
	CUNÉO.
Clinique chirurgicale.	GOSSET.
	GRÉGOIRE.
	LENORMANT.
Clinique ophtalmologique.	TERRIEN.
Clinique urologique.	MARION.
	BRINDEAU.
Clinique d'accouchements	COUVELAIRE.
	JEANNIN.
Clinique gynécologique.	PROUST.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie.	OMBRÉDANNE.
Clinique thérapeutique médicale.	RATHERY.
Clinique oto-rhino-laryngologique.	LEMAITRE.
Clinique thérapeutique chirurgicale.	Pierre DUVAL.
Clinique propédeutique.	SERGENT.
Clinique de la Tuberculose.	BEZANÇON.
Clinique chirurgicale orthopédique de l'adulte.	MATHIEU.
	HOVELACQUE.
	MULON.
Professeurs sans chaire.	OLIVIER.
	VERNE.
	MOCQUOT.



II. — AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM.	MM.
BÉNARD (Henri) . Pathologie médicale.	LANTUÉJOUL ... Obstétrique.
BERNARD Étienne. Pathologie médicale.	LAROCHE (Guy) . Pathologie médicale.
BOULIN Pathologie médicale.	LEMAIRE Pathologie expérimentale
BULLIARD Histologie.	LEVEUF Pathologie chirurgicale.
CATHALA Pathologie médicale.	M ^{lle} J. LÉVY..... Pharmacologie.
CHEVALLIER Pathologie médicale.	LÉVY-VALENSI .. Neurologie et Psychiatrie.
DOGNON..... Physique.	MOREAU Pathologie médicale.
FEY Urologie.	MOULONGUET ... Pathologie chirurgicale.
GALLIARD..... Parasitologie.	MOUQUIN Pathologie médicale.
GASTINEL..... Bactériologie.	OBERLING..... Anatomie pathologique.
DE GAUDART D'ALLAINES. Pathologie chirurgicale.	PETIT-DUTAILLIS Pathologie chirurgicale.
GAYET Physiologie.	PIÉDELIÈVRE... Médecine légale.
GIROUD..... Histologie.	PORTES Obstétrique.
HAGUENAU Pathologie médicale.	RICHET Physiologie.
HALPHEN..... Oto-rhino-laryngologie.	SANNIÉ..... Chimie biologique.
HAZARD Pharmacologie.	SÉNÈQUE..... Pathologie chirurgicale.
HUGUENIN Anatomie pathologique.	TROISIER..... Pathologie expérimentale.
JOANNON Hygiène.	TURPIN Pathologie médicale.
LABBÉ (Henri) ... Chimie biologique.	VIGNES Obstétrique.
LACOMME Obstétrique.	WILMOTH Pathologie chirurgicale.
	J. BEZANÇON... Hydrologie.

III. — AGRÉGÉS RAPPELÉS A L'EXERCICE

pour le service des examens

MM.	MM.
ALGLAVE Pathologie chirurgicale.	LEROUX..... Anatomie pathologique.
BUSQUET Pharmacologie.	NEVEU-LEMAIRE Parasitologie.
CHAILLEY-BERT. Physiologie.	ZIMMERN..... Physique.

IV. — AGRÉGÉS CHARGÉS DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE

à titre permanent.

MM.		MM.	
ABRAMI	} Clinique médicale.	BASSET	} Clinique chirurgicale.
ALAJOUANINE ..		BROCQ.....	
AUBERTIN		CADENAT.....	
BRULÉ		GATELLIER	
CHABROL.....		HEITZ-BOYER ...	
CHIRAY		MOURE	
DONZELOT		QUENU	
DUVOIR.....		SCHWARTZ.....	
LIAN		VELTER	
PASTEUR - VALLERY - RADOT			
SÉZARY			
MM.			
ECALLE	} Clinique obstétricale.		
GUÉNIOT			
LE LORIER.....			
LÉVY-SOLAL			
METZGER			

V. — CHARGÉS DE COURS

MM.	
CHAILLEY-BERT, agrégé	Education physique.
LEDoux-LEBARD	Radiologie clinique.
WEIL-HALLÉ	Puériculture.
FREY	Stomatologie.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

EXTRAIT DU MANUSCRIT DE M. DE LA FAYETTE

1780-1781

A MA MÈRE

Paris le 10 Mars 1781

Mon cher et tendre père

A LA MÉMOIRE DE MONSIEUR ROUX
ET DE MONSIEUR CALMETTE

*Qui nous ont accueilli avec
tant de bienveillance et de
bonté dans la maison de
Pasteur.*

A MON MAITRE

MONSIEUR LE DOCTEUR A. SAENZ

Chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

M. LE PROFESSEUR ROBERT DEBRÉ

Professeur de Bactériologie à la Faculté de Médecine

Membre de l'Académie de Médecine

Médecin de l'Hôpital Hérold

A MONSIEUR LE DOCTEUR LOUIS MARTIN

Directeur de l'Institut Pasteur
Membre de l'Académie de Médecine

A MONSIEUR GASTON RAMON

Sous-Directeur de l'Institut Pasteur
Membre de l'Académie de Médecine

A MONSIEUR ALFRED BOQUET

Chef de service à l'Institut Pasteur

A MES MAÎTRES DE L'INSTITUT PASTEUR

INTRODUCTION

Peu de sujets, dans le domaine de la microbiologie, ont été, dans ces derniers temps, aussi fouillés que la culture du bacille de Koch. Cependant malgré les perfectionnements apportés dans le diagnostic bactériologique de la tuberculose, on pouvait espérer rendre encore les techniques d'isolement actuelles plus simples et plus précises. Nous exposons dans les pages qui vont suivre les recherches que nous avons effectuées dans ce but.

En premier lieu, nous nous sommes attaché à supprimer dans les techniques existantes certaines manipulations non indispensables qui entravaient considérablement la diffusion de la culture comme moyen pratique de diagnostic dans la clinique journalière.

Nous avons ainsi réussi à mettre au point une méthode d'isolement à l'acide sulfurique et neutralisation à la soude, dérivée de celles de LOEWENSTEIN et de PETRAGNANI. Cette nouvelle technique offre l'avantage de supprimer les centrifugations, de permettre la recherche directe du bacille après homogénéisation et enfin de faire, grâce à la neutralité exacte du produit traité, des études comparatives par inoculation au cobaye.

Nous avons effectué des expériences nombreuses et extrêmement variées pour étudier les bases de la méthode que nous avons préconisée et pour nous assurer de sa sensibilité et de sa précision.

Nous avons commencé par démontrer que les milieux de LOEWENSTEIN et de PETRAGNANI à l'asparagine sont les

plus sensibles dont nous disposons à l'heure actuelle pour la culture du bacille de Koch.

Nous avons ensuite reconnu par une étude de la sensibilité comparée de la culture et de l'inoculation au cobaye que, si cette dernière se révèle un peu plus sensible, par contre la première offre l'avantage de fournir des résultats beaucoup plus rapides et permet en outre de différencier, par le simple aspect des colonies, les souches d'origine humaine et bovine.

Enfin, une étude comparative de notre méthode avec celle de HORN, qui passe pour être la plus précise pour l'ensemencement des produits pathologiques, nous a révélé la supériorité incontestée de la technique que nous avons préconisée.

Au cours de nos recherches, nous avons démontré que, toutes les fois où l'on soupçonne l'origine tuberculeuse d'une affection méningée, il suffit, pour mettre en évidence le bacille de Koch, d'ensemencer directement le liquide céphalo-rachidien aussitôt que possible après son prélèvement aseptique sur 6 tubes des milieux de LOEWENSTEIN ou de PETRAGNANI à l'asparagine. En outre, quand on désire établir un diagnostic précoce, dans les cas où le liquide céphalo-rachidien est négatif à l'examen direct, on doit rechercher des bacilles acido-résistants dans les produits de raclage des tubes ensemencés avant l'apparition de toute colonie visible à l'œil nu. En mettant en pratique cette méthode, nous avons pu poser un diagnostic après 7 à 10 jours, c'est-à-dire 10 à 12 jours avant que les cobayes inoculés simultanément aient accusé le moindre signe de tuberculose.

La lecture du chapitre relatif au diagnostic bactériologique des produits pathologiques secondairement infectés tels que les crachats, les sédiments urinaires et les liquides de lavage d'estomac permet de faire les constatations suivantes : dans les cas où ces produits présentent des bacilles décelables à l'examen direct, la culture suffit pratiquement et remplace l'inoculation au cobaye. Cependant lorsqu'ils

sont négatifs à l'examen direct, il est indispensable de pratiquer simultanément la culture et l'inoculation car ces deux méthodes se complètent.

La deuxième partie de ce travail est consacrée à la mise en évidence de la bacillémie tuberculeuse chez les malades de la clinique humaine et chez les animaux expérimentalement infectés. L'intensité et l'ampleur de la bacillémie expérimentale dépendent de la dose et de la voie d'inoculation. L'ensemble de nos constatations sur ce point peut être résumé ainsi : bacillémie initiale précoce et transitoire durant de quelques heures à quelques jours pour diminuer et même disparaître dans la suite et réapparaître dans la période terminale chez les animaux qui meurent de tuberculose évolutive.

Nos expériences sur les bases expérimentales de la méthode de LOEWENSTEIN pour déceler la bacillémie tuberculeuse dans la clinique humaine ont infirmé plusieurs des assertions de l'auteur viennois. Nous avons démontré, contrairement à ce qu'admet LOEWENSTEIN, que les microcolonies de bacilles acido-résistants obtenues par râclage des tubes ensemencés sont constituées par des amas de cadavres de bacilles apportés par les liquides employés pour le traitement des produits à ensemer.

Les résultats de LOEWENSTEIN relatifs à la fréquence de la bacillémie non seulement au cours de la tuberculose mais encore dans d'autres maladies nerveuses et rhumatismales n'ont pas été confirmés par les nombreux travaux de contrôle, la plupart d'entre eux, au contraire, ont abouti à une conclusion tout à fait opposée. Un millier d'échantillons de sang qui provenaient de malades tuberculeux et que nous avons ensemencés suivant les prescriptions de LOEWENSTEIN n'ont donné que 1,2 % de résultats positifs. Les cultures effectuées chez un nombre important de rhumatisants ou de déments précoces sont restées toujours négatives. Ces résultats coïncident avec ceux obtenues par les experts

nommés par la Session d'Hygiène de la Société des Nations. Une enquête auprès des cliniciens qui avaient fourni les échantillons de sang positifs, nous a permis de reconnaître que la bacillémie, dans l'infection tuberculeuse humaine, présente les mêmes caractères que dans la tuberculose expérimentale des animaux. En nous inspirant de ces faits, il nous a été possible de déceler la présence du BCG par hémoculture chez des enfants qui avaient ingéré à leur naissance ces bacilles vaccins 4 à 6 heures avant la prise de sang. En faisant état de ces constatations, M. Robert DEBRÉ, A. SAENZ et Robert BROCA ont réussi à mettre en évidence la bacillémie au début de la tuberculose de l'enfance et à démontrer que la présence de quelques germes dans le sang circulant ne permet aucunement de prévoir une localisation métastatique et moins encore une évolution fâcheuse de la maladie.

Enfin malgré la supériorité du milieu de LOEWENSTEIN, nous avons constaté que l'hémoculture est moins sensible que l'inoculation au cobaye pour la mise en évidence de la bacillémie tuberculeuse. Nous avons donné les raisons expérimentales de cette supériorité. L'hémoculture et l'inoculation fournissent des résultats concordants dans les cas où le sang contient moins de 20 bacilles par centimètre cube, même lorsqu'on se contente d'ensemencer le culot de sang pur simplement rendu incoagulable et laqué à l'eau distillée. Mais pour les échantillons qui contiennent une moindre quantité de bacilles, l'inoculation se montre plus sensible que la culture à condition de prolonger l'observation de l'animal au moins pendant 6 mois et de ne considérer les cobayes comme négatifs que s'ils ne réagissent pas à la tuberculine avant ce terme.

Dès maintenant nous tenons à faire remarquer qu'il ne sera pas question ici des nouveaux procédés de diagnostic bactériologique de la tuberculose qui reposent sur la découverte des formes filtrantes du bacille de Koch et sur l'activation, dans l'organisme du cobaye, des bacilles issus de

l'ultravirus tuberculeux par des injections hebdomadaires d'extrait acétonique : ce procédé a déjà été étudié dans les laboratoires de recherches sur la tuberculose par ses auteurs, M. VALTIS, NÈGRE et Van DEINSE. Nous n'envisagerons dans notre travail que la recherche du bacille de Koch sous sa forme bacillaire classique facilement cultivable, pathogène pour l'homme et les animaux sensibles. Nous renvoyons donc pour l'étude de cette question aux publications de ces auteurs et en particulier à l'excellent ouvrage de M. VALTIS sur le virus tuberculeux où toutes ces questions se trouvent admirablement exposées.

Au seuil de notre travail, qu'il nous soit permis d'exprimer notre profonde et affectueuse gratitude à notre Maître le Dr SAENZ qui nous a amicalement accueilli dans son laboratoire à notre entrée à l'Institut Pasteur. Depuis plus de trois ans, nous avons eu le grand honneur de travailler sous sa direction et d'être associé à ses recherches. Nous lui devons le sujet de cette thèse qui sans son précieux enseignement n'aurait pu être réalisée.

HISTORIQUE DE LA CULTURE DU BACILLE DE KOCH

Dans l'historique de la culture du Bacille de Koch, on peut distinguer deux périodes également décisives. La première (1884-1924) commence avec Robert Koch, deux ans après la découverte du bacille qui porte son nom. Cet auteur, après des tentatives nombreuses et infructueuses, réussit à obtenir une culture de bacilles tuberculeux en partant de tubercules ramollis, préalablement broyés etensemencés sur un milieu constitué par du sérum coagulé de bœuf et de mouton. Des colonies macroscopiques, petites et écailleuses, apparurent dans un délai de douze à quinze jours, et depuis elles se montrèrent repiquables et réinoculables en série au cobaye.

Continuant ses recherches, Koch échoue dans sa tentative de cultiver le bacille tuberculeux sur les milieux nutritifs pauvres, comme la gélose et le bouillon simple, et après avoir relaté tous ses essais, il déclare : « Il n'y a pas à espérer que la culture du bacille de la tuberculose joue un très grand rôle dans l'étude de la maladie. »

Trois ans après, en 1887, NOCARD et ROUX publient, dans les *Annales de l'Institut Pasteur*, leur important mémoire, apportant un perfectionnement décisif de technique avec l'introduction de la glycérine, ajoutée en proportion convenable (5 à 8 p. 100) dans le bouillon, la gélose ou le sérum ; ces milieux nutritifs pauvres deviennent alors particulièrement favorables au développement et à la multiplication du bacille de Koch. Un an plus tard, A. PAWLOWSKY, également de l'Institut Pasteur, décrit la méthode de culture

du bacille de Koch sur pomme de terre en bouillon glycé-
riné, utilisant pour cela des tubes de Roux (tubes à essais
avec un étranglement au niveau du tiers inférieur), depuis
lors d'un usage courant dans les laboratoires. Deux ans
après, en 1889; BEZANÇON et GRIFFON introduisent leur
milieu de culture à base d'eau peptonée glycinée à 5 p. 100,
gélifiée à 3 p. 100, et additionnée de sang de lapin ou de
cobaye.

L'emploi du milieu de culture à base d'œuf, proposé par
CAPALDI en 1896, n'est entré en pratique que lorsque DOR-
SET, en 1902, l'a utilisé en solution dans du sérum physio-
logique à 10 p. 100. LUBENAU le perfectionna en ajoutant,
par œuf, 30 p. 100 de son poids de macération de viande
glycinée à 5 p. 100.

Une des tentatives les plus anciennes pour rendre prati-
quement utilisable la recherche culturale du bacille de la
tuberculose dans les produits pathologiques est due à SPEN-
GLER. Déjà en 1900, cet auteur s'adresse aux vapeurs de
formol pour détruire les microbes d'association secondaire
existant dans les crachats. Ces vapeurs se dégagent de
quelques gouttes de formol versées sur le papier buvard
du couvercle de la boîte de PETRI, où les crachats étaient
étalés en couche mince. SPENGLER observe qu'après un
contact de deux heures à 25°, le matériel ainsi traité se débar-
rassait des microbes associés, et que les crachats pouvaient
alors êtreensemencés sur le milieu préconisé par Robert
Koch.

Un peu plus tard, en 1904, PIATKOWSKI arrive à des résul-
tats identiques en faisant agir directement deux ou trois
gouttes de formol sur le matériel émulsionné dans 10 cm³ de
bouillon, et en ensemencant tous les quarts d'heure sur
gélose ordinaire (contrôle des germes banaux), et sur gélose
glycinée.

Ces méthodes au formol n'ont pas rencontré de succès
dans la pratique courante, et il faut arriver jusqu'aux tenta-

tives de UHLENHUTH (1908-1909), avec l'emploi de l'antiformine pour réaliser la culture du bacille de Koch. La technique consiste à mélanger parties égales de crachats et d'antiformine à 30 p. 100 ; après un contact d'une heure, on centrifuge, on lave le sédiment et enfin, on ensemeence le culot sur sérum glycérimé ou sur pomme de terre glycérimée. Des modifications plus ou moins importantes ont été introduites dans la technique primitive à l'antiformine par WEBER et DRETERLIN, DONGEZ, LYALL, soit dans la quantité d'antiformine employée, soit dans la préparation du produit à ensemeencer. Actuellement encore, elle est employée par CANEIK et MAZEFOVA, HERMANN, et surtout dans les pays anglo-saxons, où STANLEY GRIFFITH et son école, MEYER, CAPANUI considèrent l'emploi de l'antiformine comme supérieur à celui de l'acide sulfurique.

Cette période dans la culture du bacille de Koch atteint son point culminant en 1915 avec les recherches de PETROFF (de SARANAC). A cette date, il publie son procédé bien connu d'isolement du bacille de Koch en partant de produits infectés secondairement. Dans un premier temps, PETROFF introduit la soude à 4 p. 100 dans le but de détruire la flore secondaire du matériel infecté. Dans une série d'expériences bien conduites, il démontre que ce contact avec la soude pendant un temps raisonnable détruit les germes banaux sans altérer la vitalité du bacille de Koch. Dans un second temps, il perfectionne le milieu de Lubenau en ajoutant à ce milieu de culture un colorant antiseptique, le violet de gentiane, dans le but de détruire les germes d'association secondaire et afin de permettre l'ensemencement direct de produits légèrement contaminés.

Depuis lors, en employant le procédé de PETROFF, on a pu prouver qu'un certain nombre de produits, qui ne présentaient pas de bacilles à l'examen direct, étaient capables de donner une culture de bacilles de Koch.

Cette méthode, généralisée en France grâce aux travaux

de LIMOUSIN du laboratoire du professeur CALMETTE, fut reconnue comme utile dans la pratique par de nombreux auteurs, notamment par DESPEIGNES, TSETSU, LA BOURDELLÈS et HENRY, MOREAU, KRISTENSEN et JENSEN, PROSPERT, JENSEN et HUSTED, HATRIK, CAPUANI.

En Amérique, CORPER et UYEI remplacent le violet de gentiane préconisé par PETROFF par le cristal-violet qui permettrait de rendre élective même la pomme de terre (après immersion pendant quelques heures dans une solution de carbonate sodique additionnée de 0,93 p. 110 de cristal-violet). Mais d'après les recherches de SANCHEZ, il n'y aurait pas une grande différence entre les divers violets essayés (cristal-violet, violet de méthyle, violet de gentiane, violet de lie).

De 1923 à 1926, PETRAGNANI, après avoir préparé un milieu électif à base d'œuf, de lait, de peptone et de vert malachite, fait des recherches sur les milieux additionnés de substances colorantes. Elles aboutissent à cette conclusion, que le vert malachite est mieux approprié que le violet de gentiane pour rendre électifs les milieux nutritifs, car il arrête complètement le développement des moisissures et des autres germes de la flore secondaire sans empêcher le développement du bacille tuberculeux. De plus, PETRAGNANI utilise dans sa méthode de culture la soude à 4 p. 100, qu'il laisse comme PETROFF en contact pendant une demi-heure avec les produits à ensemercer ; puis il neutralise avec l'acide chlorhydrique à 10 p. 100, en présence de quelques gouttes de teinture de tournesol comme réactif indicateur.

La supériorité du milieu de PETRAGNANI sur celui de PETROFF a été confirmée par de nombreux auteurs, entre autres : BLECHMANN, CHIARELLO, FRONGIA, BERTRAND, CASTELLI, LICHTENSTEIN, BLUMENBERG, ACCORIMBONI, RAFFO, TERZANI, SWEANY, MAX EVANOFF et A. GROSS, A. GUERNON.

Cependant, jusqu'en 1924, la culture du bacille de Koch, en partant de produits infectés secondairement, est considérée comme trop difficile pour pouvoir entrer dans la pratique courante du laboratoire, la grande difficulté consistant dans l'élimination rapide des microbes d'association secondaire et des saprophytes acido-résistants banaux. Après les essais de BOSSAN et BAUDY, qui, les premiers, employèrent, en 1922, l'acide sulfurique à 40 p. 100 pour le traitement des crachats, ce sont les travaux de LOEWENSTEIN et ceux de son élève Sumijoski, qui, en systématisant l'emploi de l'acide sulfurique, parviennent à modifier essentiellement le problème de la culture du bacille tuberculeux en supprimant les obstacles signalés précédemment.

Déjà en 1924, LOEWENSTEIN, après avoir démontré expérimentalement la résistance du bacille tuberculeux aux diverses concentrations acides ou alcalines, décrit sa méthode de culture. Elle consistait primitivement à ajouter à un volume de crachats infectés 20 p. 100 d'une solution d'acide sulfurique à 40 p. 100 ; le sédiment de centrifugation était ensuite lavé à l'eau distillée stérile et ensemencé sur pomme de terre glycinée, qui fut remplacée finalement par son milieu à base d'œuf, d'asparagine, de rouge Congo ou de vert malachite.

Depuis lors, un grand nombre d'auteurs ont eu l'occasion de confirmer l'importance du traitement par l'acide sulfurique des crachats, urines ou autres produits tuberculeux contenant une flore mixte. Dans ce sens, les expériences de PULCHER, relatives à la résistance et à la survivance du bacille de Koch à un contact de cinq heures avec une solution d'acide sulfurique à 41 p. 100, sont réellement probantes.

Cependant, c'est à HORN que revient le mérite d'avoir apporté à la technique primitive de LOEWENSTEIN la précision dont elle manquait, et de l'avoir rendue applicable, par l'emploi de concentrations appropriées aux différents

produits pathologiques, aux nécessités de la clinique journalière.

Dans une série de recherches conduites avec une grande rigueur scientifique, HOHN a insisté, depuis 1926, sur les détails de la concentration nécessaire de l'acide dans chaque cas, (entre 10 et 12 p. 100; 8, 2 pour la culture des urines), en ne prolongeant jamais son action plus d'une demi-heure. L'acidité du sédiment d'ensemencement, l'humidité nécessaire du milieu de culture spécial à base d'hématine et de vert malachite, tout a été étudié d'une manière systématique et sur une si vaste échelle qu'à l'heure actuelle on attribue à HOHN une méthode créée en réalité par LOEWENSTEIN et ses collaborateurs.

Après, les publications de LOEWENSTEIN et de HOHN, les confirmations de la supériorité de la méthode à l'acide sulfurique pratiquée avec les particularités techniques suggérées par HOHN, étaient devenues tellement nombreuses, qu'elles avaient créé un accord unanime, ainsi que le démontrent les recherches de : SCHMIDT, SCHRADER, SUETTERLIN, SONNENSCHNIG, ROGUSKI, SEELEMAN, KLINGMULLER, ENGEL, JACOBI, ROLOFF, MATTHIES, MANCINI, LOEWY, LANG, KEMKES, KARSTEN, HUCK, KRAMER, HAUPTMANN et BURTSCHER, DIMTZA, CORPER, SUQUE, REC, ONRZECZOWSKI, KRAUSE, LICHTENSTEIN, VERDINA, KNORR et FRIEDRICH.

La culture du bacille de Koch se révèle tellement supérieure au simple examen direct, que SONNENSCHNIG entre autres, en se servant de la méthode de HOHN, obtient 183 cultures positives sur 1.075 produits avec examen direct négatif.

D'autres auteurs, comme WOLTERS et KORTHOFF, emploient l'acide sulfurique comme agent d'isolement, mais utilisent le milieu à l'œuf liquide de BESREDKA qui, d'après eux, offre plus d'avantages que les milieux solides.

Cette revue d'ensemble nous montre que les auteurs qui

se sont occupés de la culture du bacille de Koch en partant de produits secondairement infectés, se sont servis soit de la soude et de l'acide chlorhydrique (PETROFF, PETRAGNANI), soit de l'acide sulfurique. En ce qui concerne cette dernière méthode, si LOEWENSTEIN considère comme nécessaire avant l'ensemencement les lavages et centrifugations successifs pour se débarrasser de l'acide, par contre, HORN soutient qu'il suffit d'ensemencer sans lavages préalables le culot de centrifugation du produit ainsi traité.

PRINCIPAUX MILIEUX DE CULTURE

MILIEU DE ROBERT KOCH

Répartir un mélange, à parties égales, de sérum de bœuf et de mouton dans des tubes stériles sur une hauteur de 5 à 6 centimètres. Incliner les tubes dans l'étuve à coagulation en évitant de mouiller les cotons. Chauffer jusqu'à coagulation complète de tous les tubes sans dépasser 70-72°. Éteindre, et quand l'étuve est refroidie, retirer les tubes, flamber et enfoncer les cotons ; capuchonner.

MILIEU DE NOCARD ET ROUX

Sérum de bœuf glycérimé à 4 p. 100.

Même préparation que pour le milieu précédent, mais avant la coagulation, glycérimiser préalablement le sérum à 4 p. 100.

POMME DE TERRE GLYCÉRINÉE A 5 P. 100.

On coupe avec un emporte-pièce des tranches demi-cylindriques de grosses pommes de terre, de telle sorte que chaque tranche, débarrassée de sa pelure, ait environ 5 à 6 centimètres de longueur et une largeur correspondant au diamètre intérieur des tubes. Les tranches, fraîchement coupées, doivent être immergées aussitôt dans un cristalliseur contenant une solution à 10 p. 100 de bicarbonate de soude. On les y laisse tremper une ou deux heures pour neutraliser

l'acidité de la pomme de terre, puis on les essore dans un linge et on les introduit une à une dans chaque tube à essai dont on a préalablement garni le tiers inférieur jusqu'à l'étranglement de bouillon glycérimé à 5 p. 100. On bouche à l'ouate et on stérilise en une seule fois à l'autoclave à 120° pendant 30 minutes. Au sortir de l'autoclave, on obture les tubes avec des capuchons de caoutchouc stérilisés pour éviter l'évaporation de leur contenu.

MILIEU DE CALMETTE ET GUÉRIN

Pomme de terre biliée glycérimée à 5 p. 100.

La bile est recueillie aussi fraîche que possible à l'abattoir. Elle est d'abord passée sur un tamis métallique à mailles très fines, puis répartie en ballons, et stérilisée à 120° pendant une demi-heure. Les ballons sont mis au repos, et il est indiqué de ne se servir de la bile qu'ils contiennent qu'après un ou deux mois ; il se forme, en effet, dans les ballons un abondant dépôt jaune d'or, dont on se débarrasse par filtration sur papier au moment de l'usage. Les pommes de terre sont découpées à l'emporte-pièce, à la manière ordinaire, lavées à l'eau de robinet, et placées pendant trois heures au bain-marie à 75° dans la bile glycérimée à 5 p. 100. Elles sont ensuite réparties dans les tubes étranglés de Roux, à la partie inférieure desquels on met de la bile glycérimée à 5 p. 100. On stérilise une demi-heure à 120°. Après ce traitement, les pommes de terre ont diminué de volume, et ont pris une teinte gris verdâtre.

MILIEU DE BEZANÇON ET GRIFFON

Faire fondre au bain-marie des tubes de gélose glycérimée à 6 p. 100 et la maintenir liquide à une température d'environ 50°. A deux parties de cette gélose, ajouter une partie de jaune, puisé en plein centre de l'œuf au moyen d'une

pipette à boule à grosse effilure. Pour que la manipulation soit faite aseptiquement, il suffit de plonger l'œuf dans l'eau bouillante, de l'y laisser une minute, ce qui modifie la consistance du blanc et permet de le traverser avec la pipette après que l'on a fait sauter une parcelle de la coque. Le jaune est alors aspiré seul sans difficulté. Géluse et jaune sont alors soigneusement mélangés par inclinaisons répétées et redressement du tube ; puis on donne aux tubes l'inclinaison voulue et on les laisse refroidir.

MILIEU DE BUC

Prendre :

Peptone Chapoteaut.....	2 gr.
Glycérine	5 gr.
Eau	100 cm ³

Neutraliser ; ajouter, pour 100 cm³ de milieu, 1 gr. de phosphate monobasique de potasse. Répartir en tubes sur une faible hauteur (2 ou 3 centimètres). Immerger dans chaque tube un tampon de coton. Stériliser à 110°-115°.

MILIEU DE BORDET ET GENGOU

Prendre :

Pommes de terre coupées en tranches	100 gr.
Eau glycerinée à 4 p. 100	200 cm ³

Cuire à l'autoclave 30 minutes à 120° ; séparer le liquide par expression à travers un linge. Filtrer sur ouate hydrophyle. A 50 cm³ de ce liquide, ajouter :

Eau salée à 6 p. 100.....	150 cm ³
Gelose	5 gr.

Faire fondre à l'autoclave à 100°, répartir en tubes et stériliser à 120°.

A chaque tube contenant ce milieu liquide à 50°, ajouter parties égales de sang défibriné d'homme ou de lapin recueilli

aseptiquement. Agiter légèrement sans faire de bulles, et coaguler en position inclinée.

MILIEU DE DORSET

Des œufs de poule soigneusement lavés et brossés dans l'eau bouillie sont immergés pendant 15 minutes dans une solution phéniquée à 5 p. 100. On les saisit entre deux feuillets de papier buvard stérile, on flambe leurs deux pôles et avec une pince pointue flambée, on pratique une ouverture sur chacun de ces pôles (au dessus de la flamme de la veilleuse d'un bec Bunsen). Au moyen d'un tube de caoutchouc stérile portant un filtre à coton stérilisé, on souffle par l'ouverture supérieure correspondant à la chambre à air, de telle sorte que le contenu de l'œuf tombe de l'ouverture inférieure dans un matras d'ERLENMEYER stérile et préalablement taré. On introduit ensuite dans le matras une quantité d'eau stérile correspondant à 40 p. 100 du poids d'œuf, et on agite pour assurer le mélange homogène du jaune, du blanc, et de l'eau, sans faire de bulle d'air. On jette le tout dans un entonnoir stérile portant une tarlatane stérile (sous un couvercle en papier buvard stérile) et on répartit aseptiquement la masse filtrée dans des tubes à essai jusqu'à une hauteur de 5 à 6 cm³. On coagule à 70° pendant deux heures en position inclinée à 15°, puis on porte les tubes à l'étuve à 37° pendant trois jours, afin de rejeter ceux qui seraient contaminés. On les obture enfin avec des capuchons de caoutchouc.

MILIEU DE LUBENAU

Même préparation que pour le milieu de DORSET, en additionnant le contenu de chaque œuf de 30 p. 100 de son poids de bouillon alcalin glycériné à 5 p. 100.

MILIEU DE BESREDKA

Mélanger 20 jaunes d'œuf battus avec un litre d'eau distillée neutre. Verser par petites portions une quantité de soude à 1 p. 100 égale à la moitié du volume total des jaunes ; ajouter ensuite la soude par centimètre cube jusqu'à ce que le milieu soit parfaitement clarifié, ce dont on s'assure chaque fois par sa transparence sous un petit volume. En général, 10 cm³ de soude ainsi ajoutés à la masse totale suffisent. Compléter avec de l'eau distillée neutre jusqu'à 7 litres.

Répartir en boîtes de Roux ou en tubes. Stériliser 20 minutes à 115°.

MILIEU DE PETROFF

Des œufs de poule sont immergés pendant 15 minutes dans l'alcool à 70°. On les casse, on mélange blancs et jaunes avec une baguette de verre flambée, et on filtre sur tarlatane stérile. A 400 cm³ de filtrat on ajoute 200 cm³ de filtrat sur gaze de macération de viande fraîche de veau (250 gr. de viande hachée + 212 gr. d'eau distillée stérile + 37 gr. 5 de glycérine stérile, mise à macérer pendant une nuit à la glacière). On additionne le tout de 6 cm³ (1 p. 100) d'une solution alcoolique de violet de gentiane à 1 p. 100. Après avoir mélangé intimement le colorant, on répartit en tubes, et on coagule en chauffant pendant 30 minutes à 85° le premier jour, 30 minutes à 75° le second et le troisième jour.

MILIEU DE PETRAGNANI

Dans un flacon d'un litre, mettre 150 cm³ de lait neutre de vache, 6 gr. de fécule de pomme de terre, 1 gr. de peptone, et une pomme de terre de la dimension d'un œuf de poule coupée en morceaux. Plonger le ballon dans l'eau bouillante,

et l'y maintenir en assurant d'homogénéité du mélange par un mouvement de rotation. Quand la masse s'épaissit, c'est-à-dire après 8 à 10 minutes, cesser d'agiter, et laisser au bain-marie bouillant pendant une heure. Sortir ensuite le ballon et le laisser refroidir jusque vers 56° , ajouter alors le contenu de 4 œufs, plus le jaune d'un cinquième œuf, 12 cm^3 de glycérine, 10 cm^3 de solution de vert malachite Höchst à 2 p. 100 dans l'eau distillée. Bien mélanger par agitation, filtrer sur gaze stérile dans un ballon stérile, répartir stérilement en tubes. Coaguler en position inclinée par chauffage pendant 30 minutes à 85° . Stériliser de nouveau le lendemain par un chauffage de 30 minutes à 75° et sortir les tubes encore chauds.

MILIEU DE HOHN

Mélanger stérilement 3 parties d'œuf frais entier et une partie de bouillon glycérimé à 5 p. 100 non alcalinisé. Répartir le mélange en tubes et coaguler en position inclinée, en chauffant trois fois pendant une demi-heure à 75° , à 24 heures d'intervalle. Le milieu ne formant pas d'eau de condensation, on ajoute quelques gouttes de bouillon non alcalinisé, sans glycérine, au fond des tubes. Avant de procéder à la coagulation, on mesurera exactement le pH du milieu en en mélangeant deux gouttes avec 15 cm^3 d'eau physiologique. Sa valeur doit être comprise entre 7,2 et 7.

MILIEU Z. DE HOHN A L'HÉMATINE

A 100 cm^3 d'œuf frais entier bien mélangé par agitation pendant 5 minutes, on ajoute 3 cm^3 d'hémoglobine obtenue en hémolysant des globules rouges de mouton lavés, par un volume égal d'eau distillée stérile. Ce mélange prend un ton rouge brique. Ajouter alors 50 cm^3 de bouillon non alcalinisé glycérimé à 10 p. 100 et additionné de 5 cm^3 de vert

malachite à 1 p. 100. Bien mélanger le tout, répartir dans des tubes à raison de 6 à 7 cm³ par tube, et les laisser à la glacière pendant une demi-heure pour éviter la formation de bulles d'air dans le milieu. Coaguler en position inclinée en chauffant pendant 30 minutes à 80°. Mettre au fond de chaque tube 0,8 cm³ environ de bouillon non alcalinisé sans glycérine.

MILIEU DE PETRAGNANI A LA CIRE D'ABEILLE

Prendre :

Lait.....	150 gr.
Fécule de pomme de terre.....	6 gr.
Peptone Chapoteaut	1 gr.

Placer ce mélange au bain-marie à 100° pendant un quart d'heure, avec une pomme de terre épluchée et coupée en petits morceaux, ajouter 10 cm³ de cire d'abeille en solution chloroformique, faite extemporanément en mettant 3 gr. de cire d'abeille à fondre au bain-marie dans 10 cm³ de chloroforme.

Après avoir versé la cire d'abeille, on agite rapidement avec une baguette de verre pour bien répartir la cire dans la masse et ceci pendant un quart d'heure, jusqu'à disparition complète du chloroforme. Puis on ajoute 4 œufs entiers et un jaune d'œuf. Après homogénéisation, filtrer sur gaze stérile et ajouter au filtrat 10 à 15 cm³ de solution à 2 p. 100 de vert malachite.

Distribuer rapidement et aseptiquement dans des tubes à essais et coaguler à 85-90° pendant une demi-heure, une seule fois.

On peut glycérier ce milieu de 3 à 5 p. 100 s'il s'agit d'isoler des bacilles humains.

MILIEU DE LOEWENSTEIN

On commence par préparer un liquide nutritif avec :

Phosphate monopotassique	1 gr.
Asparagine	3 »
Citrate de soude.....	1 »
Glycérine à 30° neutre	60 »
Sulfate de magnésium.....	1 »
Eau distillée	1.000 cm ³

Cette solution, portée deux heures à 100°, se conserve sans s'altérer.

A 150 cm³ de cette solution on ajoute, dans un ballon stérile contenant des perles de verre :

Farine de pommes de terre (Merk).....	6 gr.
Glycérine neutre à 30° stérilisée	12 gr.

On agite et on chauffe à 100° pendant 15 minutes, puis une heure à 56°.

A ce mélange maintenu à 56°, on ajoute en agitant continuellement avec des perles de verre placées d'avance dans le vase stérile :

4 œufs complets plus 1 jaune d'œuf.

5 cm³ d'une solution aqueuse stérile de vert-malachite (MERCK) à 2 p. 100.

On peut substituer au vert malachite 10 cm³ d'une solution aqueuse stérile à 2 p. 100 de rouge Congo.

On filtre sur gaze stérile et on répartit en tubes stériles à raison de 5 à 6 cm³ par tube. On tyndallise deux jours de suite à 80-86° en vapeur humide pendant deux heures chaque jour. On laisse les tubes pendant 24 heures à l'étuve à 38° pour contrôler leur stérilité.

MILIEU DE PETRAGNANI A L'ASPARAGINE

(Modification de A. Saenz.)

On fait dissoudre dans un vase stérile d'Erlenmayer d'un litre contenant 100 gr. de billes de verre stériles, et où l'on a préalablement versé 250 gr. de lait frais de vache et

16 gr. de fécule de pomme de terre (Vogue), 1 gr. 50 d'asparagine (POULENC).

On fait bouillir au bain-marie en agitant fréquemment pendant une heure jusqu'à ce que le mélange prenne une consistance de purée épaisse ; on refroidit jusqu'à 60°, et on ajoute 8 œufs entiers et 2 jaunes d'œuf. On agite, et lorsque l'émulsion est bien homogène, on filtre à l'aide d'un entonnoir muni d'une gaze stérile. On ajoute au filtrat :

Glycérine stérile	24 gr.
Solution aqueuse de vert malachite à 2 p. 100.....	15 cm ³

On transvase ce mélange dans un appareil répartiteur, et on distribue en tubes de 19 millimètres de diamètre à raison de 8 cm³ par tube. Ces tubes sont ensuite placés dans un appareil coagulateur à vapeur fluente à 85° pendant une demi-heure. On remplace alors les tampons de ouate servant à leur fermeture par des bouchons de caoutchouc massif pour éviter la dessiccation du milieu.

On contrôle la stérilité des tubes en les laissant 24 heures à l'étuve avant leur utilisation.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

SENSIBILITÉ DES DIFFÉRENTS MILIEUX DE CULTURE.

SENSIBILITÉ COMPARÉE DE LA CULTURE ET DE L'INOCULATION AU COBAYE.

ACTION DES ACIDES ET DES BASES SUR LA CULTURE DU BACILLE DE KOCH.

ÉTUDE COMPARATIVE DES DIVERS MILIEUX DE CULTURE

Le problème de la culture du bacille de Koch était donc ainsi posé au moment où A. SAENZ entreprit avec nous-mêmes des recherches sur ce sujet. Nous nous sommes attachés en premier lieu à supprimer certaines manipulations qui compliquent considérablement les techniques précédentes. Cette condition remplie dans la méthode que nous avons réussi à mettre au point, il était indispensable de savoir si elle ne perdait pas en sensibilité et en précision ce qu'elle gagnait en simplicité.

Les expériences, nombreuses et extrêmement variées qui suivent, analysent les bases expérimentales de la méthode que nous préconisons, la sensibilité des milieux que nous avons adoptés, l'étude comparative que nous avons effectuée avec la méthode de Hohn, et démontrent que nous avons pleinement atteint le double but que nous nous étions proposé.

Nos recherches ont commencé par l'étude des différents milieux solides dont nous disposions pour la culture du bacille de Koch. Les milieux liquides organiques ou synthétiques (bouillon glycérimé, milieux synthétiques de LONG, PROESKAUER et BECK, BESREDKA et JUPILLE, SAUTON) n'entrent pas en ligne de compte, car dans la pratique courante, ils servent principalement à l'obtention des corps microbiens, de la tuberculine et à la culture des souches d'origine bovine.

Parmi les milieux solides, nous pouvons à l'heure actuelle

éliminer la pomme de terre glycérimée, moins sensible que les milieux à l'œuf. Sur le premier milieu les colonies apparaissent plus tardivement et sont moins abondantes que sur le second.

Ces faits ont été clairement démontrés par les expériences comparatives de VON HUTH et LIEBERTHAL :

Milieu à l'œuf		Pomme de terre glycérimée	
Délai d'apparition des colonies	Nombre de tubes	Délai d'apparition des colonies	Nombre de tubes
8 jours	7 tubes	18 à 21 jours	8 tubes
9 à 12 »	65 »	22 à 28 »	29 »
13 à 16 »	83 »	29 à 35 »	69 »
17 à 20 »	76 »	36 à 42 »	20 »
Plus de 24 jours	27 »	Plus de 45 jours	16 »

Résumé global sur 300 tubes

	Milieu à l'œuf	Pomme de terre glycérimée
Tubes positifs.....	190	132
Tubes négatifs.....	93	141
Tubes contaminés.....	17	27

Résumé global. — Milieu à l'œuf 300 tubes : positifs 190, négatifs 93, contaminés 17.

Pomme de terre glycérimée (300 tubes) positifs 132, négatifs 141, contaminés 27.

Mais parmi les milieux à l'œuf existants, DORSET, LUBENAU, PÉTROFF, HOHN, PETRAGNANI, PETRAGNANI modifié et LOEWENSTEIN, quel est le plus sensible et le plus apte au développement du bacille de Koch ?

Dans ce but, nous nous sommes attaché à l'étude de ces

divers milieux en vue de comparer leurs qualités respectives et principalement leur sensibilité. C'est le résultat de nos multiples expériences que nous résumons ci-dessous :

Nous avons d'abord limité nos observations à deux souches, l'une bovine, depuis longtemps entretenue en divers laboratoires sous la dénomination de souche VALLÉE, l'autre humaine, la souche RATTI. Ces souches étaient cultivées sur pommes de terre + bouillon glyciné à 4 p. 100. Lorsqu'elles étaient âgées de 15 à 20 jours, on en prélevait une parcelle qui, après essorage entre deux feuilles de papier-filtre stérile, était soigneusement pesée et émulsionnée dans du liquide de Sauton dilué au quart, de telle sorte que cette émulsion-mère contînt 1 mgr. de bacilles par cm^3 . On préparait ensuite par dilutions des émulsions de concentrations décroissantes jusqu'à $1/10.000.000^{\text{e}}$ de mgr. par cm^3 . Bien entendu, pour préparer chacune de ces dilutions, on utilisait une pipette neuve stérile, et avec chaque pipette on ensemait quatre tubes en étalant sur toute la surface de chaque tube $0,5 \text{ cm}^3$ de la dilution correspondante. Les tubes ainsi ensemencés étaient ensuite maintenus horizontalement à l'étuve, et on comptait les colonies après des temps variables en notant le début de leur apparition.

Les résultats obtenus sont consignés dans les deux tableaux ci-dessous :

TABLEAU I. — (*Souche Bovine Vallée*)
Nombre de colonies après 30 jours

Quantité de bacilles ensemencés en mgr.	Lubenau	Petroff	Hohn	Petra- gnani	Loewens- tein Rouge oongo	Loewens- tein Vert malachite
0,000.1.....	11	1	22	28	innom- brables	∞
0,000.01.....	0	0	0	3	2	innom- brables
0,000.001.....	0	0	0	0	0	0

TABLEAU II. — (*Souche Humaine Ratti*)
Nombre de colonies après 30 jours

Quantité de bacilles ensemencés en mgr.	Lubenau	Petroff	Hohn	Petra- ganni	Loewens- tein Rouge congo	Loewens- tein Vert malachite
0,000.1.....	14	8	10	14	∞	∞
0,000.01.....	4	0	1	2	innom- brables	∞
0,000.001.....	0	0	0	0	0	1

Cette première série d'expériences nous révèle la supériorité incontestable des milieux de PETRAGNANI et de LOEWENSTEIN. En effet, sur ces deux milieux les colonies sont apparues plus rapidement et plus régulièrement, aussi bien avec la souche humaine qu'avec la souche bovine.

Nous avons alors résolu de limiter désormais nos recherches comparatives à ces deux milieux, et nous avons bientôt pu nous convaincre que, si l'on prend soin de supprimer la peptone dans la préparation du milieu de PETRAGNANI et de la remplacer par l'asparagine, il fournit des résultats sensiblement équivalents à ceux du milieu de LOEWENSTEIN. C'est ce que démontrent les deux tableaux ci-après.

TABLEAU I. — (*Souche Humaine Ratti*).
Nombre de colonies après 17 jours

Quantité de bacilles ensemencés en mgr.	Petragnani originel	Petragnani modifié par A. Saenz
0,000.1.....	33	44
0,000.01.....	18	21
0,000.001.....	4	17
0,000.000.1.....	0	0

TABLEAU II. — (*Souche bovine Vallée*)
Nombre de colonies après 27 jours

Quantité de bacilles ensemencés en mgr.	Petragnani originel	Petragnani modifié par A. Saenz	Loewenstein
0,000.1.....	54	72	67
0,000.01.....	7	9	10
0,000.001.....	2	2	2
0,000.000.1.....	0	0	0

De l'ensemble de nos expériences il ressort qu'on peut, sur les deux milieux (PÉTRAGNANI modifié et LOEWENSTEIN), obtenir des cultures jusqu'à des dilutions à 1 millionième (0,000.001 mgr.) et que, généralement, avec la souche humaine que nous avons utilisée, le nombre des colonies s'est montré plus élevé qu'avec notre souche bovine. Dans tous les cas, l'avantage de la substitution de l'asparagine à la peptone dans le milieu de PETRAGNANI est manifeste.

Les milieux de LOEWENSTEIN et de PETRAGNANI à l'asparagine sont excellents, et nous pensons que, jusqu'à ce qu'un autre plus sensible encore nous soit offert, c'est à eux qu'il convient de donner la préférence toutes les fois qu'il s'agit de pratiquer, en partant du sang ou de produits pathologiques quelconques, l'isolement des bacilles tuberculeux.

Ces résultats ont été confirmés dans les laboratoires de recherches sur la tuberculose à l'Institut Pasteur, où nos confrères ne se servent pas d'autres milieux pour leurs ensemencements.

SENSIBILITÉ COMPARÉE DES MILIEUX DE CULTURE ET DE L'INOCULATION AU COBAYE

Après avoir fixé notre choix sur le milieu de LOEWENSTEIN et de PETRAGNANI modifié par A. SAENZ, nous nous sommes demandé si la culture était plus sensible que l'inoculation au Cobaye ou inversement. C'est dans ce but que nous avons entrepris les expériences qui vont suivre.

Le 16 décembre 1932, on prélève avec une spatule une petite quantité de culture de la souche bovine Vallée sur pomme de terre glycinée, âgée de 16 jours. Après essorage entre deux doubles de papier-filtre stérile, on pèse avec soin les bacilles : on les introduit dans un ballon à billes de verre et on les émulsionne avec du liquide de Sauton dilué au quart avec de l'eau physiologique, de telle sorte que 1 cm³ de l'émulsion contienne 1 mgr. de bacilles. On prépare ensuite, des émulsions de concentrations décroissantes jusqu'à 1/100.000.000^e de mgr. par cm³, en prenant soin d'employer pour chaque dilution une pipette neuve stérile. Chaque émulsion est ensuiteensemencée par étalement sur deux tubes de LOEWENSTEIN et sur 2 tubes de PETRAGNANI modifié, à raison de 0,5 cm³ par tube.

Simultanément, à partir de la dilution à 1/100.000^e de mgr. par cm³ jusqu'à celle de 1/100.000.000^e, on inocule chaque dilution à 4 Cobayes par voie sous-cutanée, à raison de 0,5 cm³ par Cobaye.

Les résultats obtenus peuvent se résumer comme suit :

1^o Avec les cultures. — Des colonies se sont développées dans tous les tubes jusqu'à la dilution à 1/1.000.000^e par

cm³; à cette dernière dilution on comptait seulement 2 colonies par cm³.

2^o Avec l'inoculation au cobaye. — Les animaux qui ont reçu 1/200.000^e de mgr. (ce qui correspond, d'après CALMETTE, à environ 200 bacilles), morts prématurément de maladies intercurrentes ou sacrifiés après 4 mois et demi, présentaient tous des lésions de tuberculose grave, évolutive. Ceux qui ont reçu 1/2.000.000^e de mgr. soit environ 20 bacilles, ont également présenté des lésions tuberculeuses évolutives très nettes. Deux d'entre eux, qui avaient fourni, après 4 mois et demi, des réactions tuberculiniques fortes, avec nécrose, ont été trouvés porteurs de lésions généralisées, sans chancre ni abcès au point d'inoculation, mais avec les ganglions inguinaux et sous-lombaires correspondants hypertrophiés et caséifiés. Ces deux cobayes avaient en outre des ganglions trachéo-bronchiques volumineux et quelques granulations sur les poumons.

Dans la série des cobayes qui avaient reçu 1/20.000.000^e de mgr., soit environ 2 bacilles, trois sont morts entre le 90^e et 110^e jour qui suivirent l'inoculation, sans rien présenter de suspect et sans avoir réagi à la tuberculine. Un seul, qui avait succombé au 60^e jour, avait une légère hypertrophie des ganglions inguinaux profonds et sous-lombaires correspondants; les frottis de ces ganglions firent découvrir quelques rares bacilles acido-résistants typiques.

Enfin, dans la série des cobayes inoculés avec 1/200.000.000^e de mgr. aucun n'a réagi à la tuberculine. Ils ont été sacrifiés 4 mois et demi plus tard, leur autopsie n'a rien révélé de suspect. Par conséquent, jusqu'à la dilution à 1/2.000.000^e qui correspond à 20 bacilles par cm³, les cultures et les inoculations fournissent des résultats concordants. Mais, comme sur les milieux de culture il ne se développe que 2 colonies par cm³, il faut admettre, qu'un certain nombre d'unités bacillaires est nécessaire pour donner lieu au développement d'une colonie, ou bien que

dans les cultures de 16 jours, une grande proportion de bacilles ont achevé leur évolution et perdu l'aptitude à se reproduire, de sorte que sur 20 éléments bacillaires de cet âge, colorables au Ziehl, 2 seulement sont cultivables.

Dans les conditions de nos expériences, le cobaye se révèle un peu plus sensible que la culture, puisqu'un animal sur quatre est tuberculisé par 2 bacilles, alors qu'à cette dilution la culture reste stérile. Il est possible qu'avec des cultures encore plus virulentes, on obtienne des colonies et la tuberculisation des animaux avec des taux de dilution encore plus faibles. Mais il semble bien que le chiffre indiqué par A. CALMETTE (environ 40 millions de bacilles par mgr. de culture de deux semaines) correspond à la réalité des faits, et que 2 bacilles puissent suffire à tuberculiser le cobaye, ce qui confirme les constatations déjà anciennes de FINDEL et celles plus récentes de B. LANGE, LEWENTHAL, VALTIS et VAMOSCHER.

Dans les cas où l'on dispose de produits pathologiques paucibacillaires, secondairement infectés avec des germes non pathogènes pour le cobaye, cet animal garde évidemment une supériorité comme agent de purification, puisque l'ensemencement ne peut être effectué qu'après traitement par des agents chimiques, qui altèrent certainement un nombre plus ou moins grand de bacilles. Cependant, dans la pratique courante, la culture doit être associée à l'inoculation, parce qu'elle élimine pour l'expérimentateur les risques d'infections intercurrentes et la tuberculose spontanée du cobaye.

En outre la culture, en dehors des cas exceptionnels où il s'agit d'infection bovine (souches dysgoniques notamment) et pour lesquels le développement sur les milieux de culture s'effectue dans le même temps que l'inoculation aux animaux sensibles (40 à 60 jours), offre l'avantage de fournir des résultats beaucoup plus rapides que l'inoculation au cobaye.

En faveur de la culture, nous devons encore faire remarquer qu'elle permet d'isoler des bacilles que le cobaye ne révèle pas et de différencier, par le simple aspect des colonies, les souches du type humain de celles du type bovin.

BASES EXPÉRIMENTALES DE LA MÉTHODE DE CULTURE DE A. SAENZ ET L. COSTIL

Dans les pages qui vont suivre, nous allons développer la méthode de culture que A. SAENZ a préconisée avec nous-même pour déceler le bacille de Koch dans les produits de la clinique humaine de provenances diverses. Dans cette méthode, qui nécessite en général l'emploi d'une solution d'acide sulfurique à 15 p. 100, dont le titre s'abaisse de moitié au cours des manipulations par addition du produit à ensemercer, on pourrait nous objecter qu'à la concentration finale de 7,5 p. 100, cette substance peut être toxique pour le bacille tuberculeux. D'autre part, la neutralisation du produit ensemençé étant obtenue à l'aide de la soude à 30 p. 100, nous nous sommes aussi demandé si le sulfate de soude ainsi formé peut empêcher le développement du bacille tuberculeux sur les milieux de culture.

C'est pour vérifier ce que ces deux hypothèses pouvaient avoir de fondé que A. SAENZ entreprit avec M. SADETTIN et nous-même les expériences suivantes :

1^o ACTION DE L'ACIDE SULFURIQUE SUR LES CULTURES DE BACILLES TUBERCULEUX D'ORIGINES DIVERSES.

Première expérience. — Action de l'acide sulfurique sur le bacille humain. Le 2 mai 1933, nous avons préparé dans du liquide de Sauton dilué au 1/4, avec une souche d'origine humaine (RATTI) cultivée sur pomme de terre glycérinée et âgée de 14 jours, une émulsion contenant par cm³ 10 cgr. de bacilles pesés à l'état humide, et non essorés.

De cette émulsion 0,5 cm³ était ensuite mélangé à 4,5 cm³ de solution d'acide sulfurique à 10, 20, 30 et 40 p. 100. On obtenait ainsi des suspensions microbiennes contenant 1 cgr. de bacilles par cm³, qu'on laissait en contact avec l'acide sulfurique pendant des temps variables. On se débarrassait de l'acide au moyen de trois lavages et centrifugations successifs avec du liquide de Sauton stérile. Le contrôle de la neutralité était assuré, après le dernier lavage, au moyen de quelques gouttes de teinture de tournesol. On diluait en sérum physiologique les bacilles ainsi traités à une concentration correspondant à 1/10^e de mgr. par cm³. De ce mélange 2 cm³ furent ensuiteensemencés, à parties égales, à la surface de 4 tubes de milieu à l'œuf, 2 de LOEWENSTEIN et 2 de PETRAGNANI à l'asparagine ; 4 autres tubesensemencés avec une émulsion, contenant par cm³ 0,1 mgr. de bacilles non traités, ont servi de témoins. Nous avons fait ainsi 3 séries d'expériences, suivant que la durée de contact avait été de 30, 45 ou 60 minutes.

Dans la première série, nous avons constaté que le nombre de colonies était identique dans les tubesensemencés avec les bacilles traités par l'acide sulfurique à 10, 20, 30 et 40 p. 100 pendant une demi-heure et dans les tubes témoins. En effet, 30 jours après, le développement est également abondant dans tous les tubes. Les mêmes résultats ont été obtenus avec des bacilles demeurés pendant 45 et 60 minutes au contact de concentration d'acide sulfurique à 10 et 20 p. 100. Seuls, les tubesensemencés avec les bacilles traités avec l'acide sulfurique à 30 et 40 p. 100 sont demeurés stériles.

Deuxième expérience. — Les expériences précédentes ne nous ont pas permis de mettre en évidence l'action nocive de l'acide sulfurique sur le bacille de Koch, étant donné la dose massive de bacillesensemencés. Nous avons donc recommencé une nouvelle série de cultures en employant des émulsions plus diluées, contenant de 0,001 à 0,000.01

de mgr. de bacilles par cm^3 et qui ont été laissées au contact de l'acide sulfurique à 10, 15 et 20 p. 100 pendant une demi-heure. Les résultats de cette expérience sont consignés dans le tableau ci-dessous :

Nombre de colonies après 39 jours

Quantité de bacilles ensemencés en mgr.	Témoins	Traités par SO^4H^2 à 10 p. 100	Traités par SO^4H^2 à 15 p. 100	Traités par SO^4H^2 à 20 p. 100
0,001.....	Innom- brables	Innom- brables	Innom- brables	Innom- brables
0,000.1.....	—	210	97	70
0,000.01.....	150	150	70	35

Troisième expérience. — Action de l'acide sulfurique sur le bacille aviaire. — Le 16 avril 1934, nous avons préparé dans du liquide de Sauton dilué au quart, avec une souche d'origine aviaire (Ten... culture sur pomme de terre glycérinée, âgée de 14 jours) des émulsions contenant de 0,001 à 0,000.01 mgr. de bacilles par cm^3 . Ces dilutions furent mises au contact de l'acide sulfurique à 5, 10, 15 et 20 p. 100 pendant une demi-heure. Le tableau ci-dessous contient les résultats de cette expérience.

Nombre de colonies après 30 jours

Quantité de bacilles ensemencés (mgr.)	Témoins	Traités par l'acide sulfurique à			
		5 p. 100	10 p. 100	15 p. 100	20 p. 100
0,001.....	Innom- brables	Innom- brables	400	75	40
0,000.1.....	—	400	95	75	40.
0,000.01.....	—	300	73	80	25

Quatrième expérience. — Action de l'acide sulfurique sur le bacille paratuberculeux. -- Nous avons refait une nouvelle série d'expériences suivant la technique précédente, mais en remplaçant la souche de bacilles aviaires par une souche de bacilles paratuberculeux.

Nombre de colonies après 40 jours

Quantités de bacilles ensemencés (mgr.)	Témoins	Traités par l'acide sulfurique à			
		5 p. 100	10 p. 100	15 p. 100	20 p. 100
0,001.....	Innombrables	25	0	0	0
0,000.1.....	200	0	0	0	0
0,000.01.....	150	0	0	0	0

Les émulsions microbiennes faites à partir d'une culture sur pomme de terre glycinée, âgée de 15 jours souche Bla... ont été laissées en contact pendant une demi-heure.

Il ressort de ces expériences, que la nocivité de l'acide sulfurique à des concentrations de 10 à 40 p. 100, laissée en contact avec des émulsions denses de bacilles des mammifères (jusqu'à 0,1 mgr. par cm³ pendant une demi-heure, est pratiquement nulle. C'est seulement aux concentrations de 30 à 40 p. 100 que l'action de l'acide sulfurique sur les bacilles devient nettement nuisible, à condition de prolonger ce traitement pendant 45 à 60 minutes.

Avec des émulsions contenant 1/1.000 à 1/100.000 de mgr. de bacilles par cm³, l'acide sulfurique à 10 p. 100 se montre parfaitement inoffensif pour le bacille de Koch.

Les souches de bacilles tuberculeux aviaires se comportent vis-à-vis de l'acide sulfurique sensiblement de la même manière que les souches de bacilles des mammifères.

Un effet contraire a été observé en étudiant comparati-

vement l'action de cet acide sur les bacilles paratuberculeux, pour lesquels il s'est montré nettement nocif à une concentration de 10 p. 100.

2^o ACTION DU SULFATE DE SOUDE sur les cultures de bacilles tuberculeux.

Le 24 mars 1933, nous avons préparé, avec une souche de bacilles humains (souche RATTI), cultivée sur pomme de terre glycélinée et âgée de 2 semaines, une émulsion contenant 10 mgr. de germes par cm^3 dans du liquide de Sauton dilué au quart avec de l'eau stérile. D'autre part, nous avons préparé 4 solutions stériles de sulfate de sodium ($\text{SO}_4\text{Na}^2 + 10\text{H}_2\text{O}$) aux concentrations respectives de 4, 8, 12 et 16 p. 100, cette dernière constituant une solution saturée à la température ordinaire. A $4,5 \text{ cm}^3$ de chacune de ces solutions, nous ajoutions $0,5 \text{ cm}^3$ de la dilution bacillaire. Chaque cm^3 de ces mélanges contenait donc 1 mgr. de bacilles. Chacun d'eux fut ensuiteensemencé sur 4 tubes de milieu de LOEWENSTEIN, à raison de $0,5 \text{ cm}^3$ par tube. Quatre tubes ont reçu l'émulsion bacillaire diluée dans la même quantité d'eau salée physiologique, et quatre autres l'émulsion bacillaire diluée dans le liquide de Sauton au quart. Ces 8 derniers tubes nous servaient de témoins.

Le 3 avril suivant, on apercevait déjà des colonies, aussi bien dans les tubes de doses croissantes à sulfate de sodium que dans les témoins. Le 12, le développement est également abondant dans tous les tubes.

Nous avons alors refait une nouvelle série de cultures en employant des émulsions plus diluées, ne contenant plus que 0,001 mgr., à 0,000.001 mgr. de bacilles par cm^3 . Les résultats furent également concordants avec ceux des tubes témoins. Nous avons même noté que, dans la série des tubesensemencés avec seulement un millionième de mgr. de bacilles tuberculeux, ceux qui étaient additionnés de sulfate de sodium à 16 p. 100 ont fourni un nombre de colonies supérieur à celui des tubes témoins. Or, cette dilution ne

renferme environ que 40 bacilles ; il est donc évident que le sulfate de sodium, même à saturation, ne se révèle aucunement toxique pour le bacille tuberculeux, qu'il n'exerce sur lui aucune action inhibitrice, et qu'il ne nuit pas à sa vitalité.

Rappelons qu'il y a quelques années, MANSEAU avait signalé que le sulfate de magnésium, même à la concentration de 20 p. 100, n'entravait pas le développement du bacille de Koch. Par conséquent, l'emploi de l'acide sulfurique, puis de la soude à 30 p. 100 préconisé dans notre méthode d'isolement du bacille de Koch, se trouve expérimentalement justifié.

ÉTUDE COMPARATIVE DE LA MÉTHODE DE CULTURE DE A. SAENZ ET L. COSTIL AVEC CELLE DE HOHN

Nous avons vu, dans les pages précédentes, que parmi les méthodes de culture les plus employées (surtout dans les pays de langue allemande), c'est indiscutablement celle de HOHN qui est considérée comme la plus sensible pour l'ensemencement des différents produits pathologiques de la clinique journalière. C'est précisément pour cette raison que nous avons voulu étudier comparativement cette méthode et celle que A. SAENZ a préconisée avec nous-même, pour en apprécier la sensibilité respective.

Pour comparer deux méthodes, il faut que l'expérimentateur soit bien au courant des détails des techniques qu'on va opposer ; c'est justement ce que nous avons mis en pratique pour réaliser cette étude comparative. Elle a été effectuée par M^{me} LENNEBERG, ancienne assistante de BRUNO LANGE, de l'Institut Robert KOCH de Berlin, qui n'avait employé pendant plusieurs années que la méthode de HOHN. Ce n'est qu'après avoir fait un stage dans notre laboratoire et s'être familiarisée avec notre méthode, qu'elle a entrepris l'étude que nous relatons ci-dessous.

Auparavant, nous exposerons d'une façon sommaire comment nous avons procédé.

Technique de HOHN : Environ 2 gr. d'organes, après avoir été préalablement broyés, sont traités par une solution d'acide sulfurique à 5 p. 100 pendant une demi-heure ; on centrifuge, on rejette le liquide surnageant, et on ense-

mence le culot ainsi obtenu, sans le neutraliser ni le laver, à la surface de 6 à 8 tubes de milieu à l'œuf-asparagine-vert malachite.

Technique de A. SAENZ et L. COSTIL : 2 gr. environ d'organes sont recueillis dans un mortier stérile et broyés à sec avec une petite quantité de sable stérilisé à 180°. On ajoute de l'eau distillée stérile en quantité variable suivant la consistance du produit. On mesure au moyen d'une pipette graduée 2 cm³ de cette émulsion qu'on traite ensuite par un volume égal (2 cm³) d'acide sulfurique à 15 p. 100 pendant 30 minutes. On introduit quelques gouttes de tournesol (réactif indicateur) et on neutralise avec une solution de soude à 30 p. 100 jusqu'à virage au lilas, limite de neutralité correspondant à un pH de 6,8 à 7,2. On ensemence en totalité, à raison de 0,5 cm³ par tube, sur 6 à 8 tubes de milieu de LOEWENSTEIN ou de PETRAGNANI dans lequel nous avons remplacé la peptone par l'asparagine.

Notre étude porte sur un ensemble de 47 organes provenant de cobayes, de lapins ou de poules expérimentalement infectés avec des souches d'origines diverses. Dans le tableau ci-dessous, nous donnons un résumé des résultats qui ont été obtenus en ensemençant dans les mêmes conditions chaque produit examiné parallèlement par notre méthode et celle de Hohn :

Nos des cas	Origine des souches	Animal	Produits	Nombre de colonies	
				Méthode de A. Saenz et L. Costil	Méthode de Hohn
1	Hum. Ba.	Cobaye	rate	9 colonies	0
2	—	—	ganglion	nombreuses	quelques
3	Av. Bis. S	Poule	foie	—	0
4	—	Lapin	foie	3 colonies	0
5	—	—	poumon	0	0
6	—	Cobaye	foie	quelques	plusieurs
7	—	—	rate	très nombreuses	très nombreuses
8	—	—	poumon	assez nombreuses	assez nombreuses
9	Av. Bis.	Cobaye	pus	0	2 colonies
10	Hum. Bo.	Lapin	cerveau	nombreuses	nombreuses
11	Hum. Ch.	Cobaye	poumon	—	—
12	—	Cobaye	rate	très nombreuses	—
13	Hum. Ga. S	Cobaye	pus	nombreuses	—
14	—	Lapin	foie	très nombreuses	—
15	—	—	rate	—	très nombreuses
16	—	—	poumon	—	—
17	—	Lapin	foie	—	—
18	—	—	rate	—	—
19	—	Lapin	foie	nombreuses	nombreuses
20	—	—	rate	—	—
21	—	Cobaye	pus	—	—
22	—	Cobaye	pus	quelques	assez nombreuses
23	—	—	rate	rares	quelques
24	—	Poule	rate	nombreuses	assez nombreuses
25	—	—	foie	—	quelques
26	—	—	rein	quelques	rares
27	L. C. R. 8	Lapin	poumon	nombreuses	nombreuses
28	L. C. R. 26	Cobaye	ganglion	—	—
29	Av. O. S.	Lapin	foie	très nombreuses	très nombreuses
30	—	—	rate	—	—
31	—	Lapin	rate	—	nombreuses
32	Av. O. R.	Poule	rate	nombreuses	assez nombreuses
33	—	—	foie	quelques	quelques
34	Av. O.	Cobaye	pus	nombreuses	—
35	—	Poule	rate	—	nombreuses
36	Hum. Ratti S.	Cobaye	pus	assez nombreuses	assez nombreuses
37	Hum. R.	Cobaye	pus	nombreuses	nombreuses
38	Bov. T.	Cobaye	ganglion	rares	quelques
39	Hum T.	Cobaye	ganglion	nombreuses	quelques
40	Hum P.	Cobaye	rate	—	très nombreuses
41	Hum T. S.	Cobaye	rate	4 colonies	0
42	Bov. V. S.	Poule	foie	très nombreuses	nombreuses
43	—	Poule	foie	nombreuses	assez nombreuses
44	—	Poule	foie	très nombreuses	très —
45	—	Poule	rate	—	nombreuses
46	—	Lapin	poumon	une colonie	une colonie
47	Hum. Ch.	Cobaye	rate	plusieurs colonies	0

Il ressort très nettement de la lecture de ce tableau que sur les 47 produits étudiés simultanément par les deux méthodes, dans un cas (N^o 9) avec le pus d'abcès d'un cobaye inoculé avec une souche d'origine aviaire traitée par la méthode de HOHN, nous avons obtenu deux colonies, tandis que les tubesensemencés après neutralisation par la soude sont demeurés stériles. Par contre, dans 4 cas (cas n^{os} 1, 4, 41 et 47) en partant du foie ou de la rate de cobayes et de lapins infectés avec des souches humaines ou aviaires, nous avons observé, dans les tubesensemencés par la méthode que nous employons, respectivement 9, 3, 4 et plusieurs colonies, alors que les tubesensemencés selon la technique de HOHN n'ont donné lieu à aucun développement. De même, nous constatons que dans les cas n^{os} 2, 25, 26, 31, 32, 39, 42 et 43, c'est-à-dire 8 cas sur 47, soit 17 p. 100, le nombre des colonies a été plus abondant avec notre technique qu'avec celle de HOHN.

En outre, notre méthode offre l'avantage de produire une homogénéisation rapide des produits à ensemen- cer, de faciliter la recherche directe du bacille de Koch, et de supprimer la centrifugation. D'autre part, grâce à leur neutralité exacte, les produits ainsi traités peuvent être inoculés au cobaye, chez lequel ils ne provoquent aucune réaction locale immédiate.

En raison de sa simplicité, de la facilité de son emploi et de sa précision, nous estimons qu'à défaut d'un procédé plus sensible, c'est à cette méthode et aux milieux de LOEWENSTEIN et de PETRAGNANI à l'asparagine qu'il convient de donner la préférence, toutes les fois qu'il s'agit de pratiquer, en partant de produits pathologiques quelconques, l'isolement du bacille tuberculeux.

APPLICATIONS PRATIQUES

DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE
DE LA MÉNINGITE TUBERCULEUSE,
DE LA TUBERCULOSE RÉNALE, PLEURALE ET PULMONAIRE



DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DE LA MÉNINGITE TUBERCULEUSE

Importance de la recherche de la « Microculture »
repiquable pour établir un diagnostic précoce

La présence du bacille de Koch dans le liquide céphalo-rachidien est le pivot sur lequel repose le diagnostic de méningite tuberculeuse. Dans les pages précédentes, nous avons démontré expérimentalement la grande sensibilité des milieux dont nous pouvons disposer aujourd'hui pour la culture du bacille tuberculeux. Cette supériorité sur les milieux employés autrefois, se manifeste par le fait que nous avons réussi le repiquage dans les milieux à l'œuf-asparagine-vert malachite des souches de bacilles tuberculeux qui avaient séjourné, pendant trois ans pour le bacille aviaire et 6 mois pour le bacille humain, dans l'armoire de notre laboratoire. Bien entendu, de telles constatations n'avaient pu être observées avec les milieux à l'œuf autrefois utilisés.

De même, dans nos expériences comparatives, nous avons démontré que, dans les produits pathologiques paucibacillaires, non infectés par une flore secondaire, la culture offre l'avantage de fournir des résultats aussi sûrs et plus rapides que l'inoculation au cobaye. Ces recherches ont amené A. SAENZ et nous-même à tirer profit, d'un côté de la grande sensibilité des milieux de culture dont nous disposons, d'un autre côté, du fait que dans l'immense majorité des cas, le liquide céphalo-rachidien ne présente pas de flore microbienne associée ; dans ces conditions, nous nous sommes

attachés à déceler la présence du bacille de Koch dans les cas de méningite tuberculeuse par l'ensemencement direct sur milieux soigneusement et récemment préparés, effectué dès que possible après le prélèvement aseptique du liquide.

Lorsque, dans de rares circonstances, la préparation colorée des frottis nous révélait des germes d'association, nous avons évidemment appliqué notre technique de purification à l'acide sulfurique.

Voici en quoi elle consiste : 10 cm³ de liquide céphalo-rachidien contaminé sont centrifugés pendant un quart d'heure à 20 minutes à une vitesse de 3.000 tours. On aspire ensuite avec une boule de MIQUEL la partie supérieure du liquide que l'on rejette, en ayant soin d'en laisser 1 cm³ avec le culot au fond du tube. On traite ce culot par 1 cm³ d'une solution d'acide sulfurique à 15 p. 100 pendant 5 à 10 minutes (ce temps est déterminé par la quantité de germes infectants) ; on ajoute quelques gouttes de teinture de tournesol (réactif indicateur), et on neutralise avec une solution de soude à 30 p. 100. La totalité du produit ainsi préparé estensemencée à raison de 1/2 cm³ par tube, sur 6 tubes de milieu à l'œuf-asparaginé-vert malachite, qui sont ensuite placés à l'étuve à 38°, en ayant soin de maintenir horizontalement la surface du milieu.

En ce qui concerne les liquides non infectés secondairement, nous recommandons dans notre technique primitive (1932) de centrifuger pendant 15 minutes à grande vitesse, 5 à 10 cm³ de L. C. R. le plus tôt possible après son prélèvement aseptique. Le culot ainsi obtenu était directementensemencé, au moyen d'une pipette finement étirée, à la surface de 6 à 8 tubes du milieu approprié. Nous prenions soin d'étaler la semence sur toute l'étendue du milieu. Si le liquide contenait des filaments ou des flocons de fibrine, la centrifugation était inutile. On prélevait alors ces flocons, qui entraînaient les bacilles s'il en existait, et on les promenait en les écrasant à la surface du milieu. On préparait des

lames avec le culot de centrifugation ou avec des flocons pour l'examen direct et, avec le reste du prélèvement, on inoculait des cobayes.

En appliquant cette technique à la recherche de bacilles de Koch dans 19 L. C. R., dont 11 ne montraient pas de bacilles à l'examen direct, nous avons obtenu, dans tous les cas, une culture positive et tous les cobayes inoculés sont devenus tuberculeux.

Nous ferons remarquer une fois pour toutes, que nous considérons comme ne contenant pas de bacilles à l'examen direct, tous les culots de centrifugation préparés comme précédemment et pour lesquels la recherche soigneuse dans des préparations colorées au ZIEHL-NEELSEN ne nous a pas permis de déceler de bacilles acido-résistants après 20 à 30 minutes.

Les résultats des recherches que nous allons développer nous ont permis de simplifier notre méthode primitive.

Voici comment nous avons procédé :

Sur 5 à 10 cm³ de liquide à examiner, 1 cm³ estensemencé directement sur 2 tubes de milieu à l'œuf-asparagine-vert malachite à raison de 0,5 cm³ par tube. Pour les liquides contenant des flocons fibrineux, ceux-ci étaient écrasés et étalés à la surface de 2 nouveaux tubes de culture. Le produit restant était ensuite centrifugé à 4.000 tours pendant 1/4 d'heure, et le culotensemencé, au moyen d'une pipette finement étirée, sur 2 tubes du milieu précédent. Enfin, 2 derniers tubes servaient à l'ensemencement de 1 cm³ du liquide surnageant après la centrifugation. Les résultats donnés par ces 8 tubes maintenus à l'étuve à 38°, en position horizontale, sont consignés dans le tableau ci-contre.

N ^o	Quantité en cm ³	Examen direct	Nombre de colonies après 30 jours			
			Flocons fibrineux	Liquide direct	Culot	Liquide surnageant
1	5	0	0	12	25	4
2	5	0	1	1	2	0
3	10	+		8	42	2
4	8	0	0	4	36	1
5	10	+	140	Innombrables		20
6	10	+	90	50	300	11
7	10	+	110	50	200	2
8	10	0		5	18	6
9	8	0		6	10	0
10	7	0		22	46	3

La même recherche pratiquée sur une nouvelle série de 30 liquides céphalo-rachidiens a donné des résultats tout à fait superposables.

La lecture du tableau ci-dessus montre, en premier lieu, que sur 10 liquides céphalo-rachidiens, dont 6 ne contenaient pas de bacilles à l'examen direct et 4 pas de flocons fibrineux, l'ensemencement direct ou après centrifugation a donné, dans tous les cas, des cultures de bacilles de Koch. Le culot de centrifugation a fourni, comme on devait s'y attendre, un nombre de colonies beaucoup plus grand que les tubes ensemencés directement sans centrifugation. Il est intéressant de constater que même l'ensemencement du liquide surnageant après la centrifugation, a été positif dans 8 cas sur 10.

Ces recherches nous ont convaincus que toutes les fois où l'on soupçonne l'origine tuberculeuse d'une infection méningée, il suffit d'ensemencer directement et le plus rapidement possible le liquide céphalo-rachidien aseptiquement prélevé sur 6 à 8 tubes de milieu, à raison de 1/2 cm³ par tube. En procédant ainsi, nous avons réussi à obtenir des cultures de bacilles de Koch dans 80 cas de méningites tuberculeuses, qui sont consignés dans le tableau suivant :

No	Service	Malade	Date	Examen direct	Macro culture	Diagnostic confirmé par la clinique
					jours	
1	Debré	Sar...	27-11-31	0	13	Méningite tuberculeuse
2	Abrami	Sig ...	13-12-31	0	15	Méningite tuberculeuse
3	Lesné	Ber...	21-12-31	0	17	Méningite tuberculeuse
4	Paisseau	Leo ..	27-12-31	0	21	Méningite tuberculeuse
5	Armand-De- lille	Rad ..	4-1-32	0	23	Méningite tuberculeuse
6	Weill-Hallé	Bor ..	13-1-32	0	18	Méningite tuberculeuse
7	Lesné	Mar...	21-1-32	0	25	Méningite tuberculeuse
8	Lesné	Cad ..	23-1-32	0	21	Méningite tuberculeuse
9	X.	Ant.	29-1-32	0	27	Méningite tuberculeuse
10	L. Bernard	Mon ..	3-12-32	0	16	Méningite tuberculeuse
11	L. Bernard	Lev ..	3-12-32	0	25	Méningite tuberculeuse
12	Lesné	Cos...	8-4-32	0	18	Méningite tuberculeuse
13	Lesné	Mar ..	18-4-32	0	17	Méningite tuberculeuse
14	Mozer	Tup ..	19-4-32	+	21	Méningite tuberculeuse
15	Abrami	Rui ..	20-4-32	+	24	Méningite tuberculeuse
16	Lesné	Ric...	23-4-32	+	19	Méningite tuberculeuse
17	Abrami	Dug ..	6-5-32	+	16	Méningite tuberculeuse
18	Abrami	Sam ..	14-5-32	+	18	Méningite tuberculeuse
19	Lesné	Che ..	21-5-32	0	45	Méningite tuberculeuse
20	Paisseau	Cle ...	25-5-32	+	21	Méningite tuberculeuse
21	Paisseau	Vin ..	25-5-32	+	21	Méningite tuberculeuse
22	Paisseau	Cha ..	25-5-32	+	21	Méningite tuberculeuse
23	Abrami	Bru ..	6-6-32	0	34	Méningite tuberculeuse
24	Lesné	Hei ..	3-6-32	+	32	Méningite tuberculeuse
25	Debré	Cer...	9-6-32	+	22	Méningite tuberculeuse
26	Paisseau	Bou...	25-6-32	+	21	Méningite tuberculeuse
27	Debré	Far ..	11-7-32	0	40	Méningite tuberculeuse
28	Lesné	Tro ..	15-7-32	0	21	Méningite tuberculeuse
29	Lesné	Ouc...	20-7-32	0	24	Méningite tuberculeuse
30	Mozer	Lem...	23-7-32	+	21	Méningite tuberculeuse
31	Mozer	Lac ..	23-7-32	+	21	Méningite tuberculeuse
32	Mozer	Bio...	23-7-32	+	21	Méningite tuberculeuse
33	Lesné	Guy ..	6-9-32	+	34	Méningite tuberculeuse
34	Debré	Gil ...	6-10-32	0	32	Méningite tuberculeuse
35	Lesné	Bru ..	16-10-32	+	15	Méningite tuberculeuse
36	Lesné	Bus ..	24-10-32	0	22	Méningite tuberculeuse
37	Lesné	Lac ..	2-12-32	0	0	Encéphalite
38	Lesné	Toc ..	6-12-32	0	28	Méningite tuberculeuse
39	Lesné	Mai ..	19-1-33	0	20	Méningite tuberculeuse
40	Lesné	Dup ..	20-1-33	+	17	Méningite tuberculeuse
41	Lesné	Bas ..	20-1-33	0	22	Méningite tuberculeuse
42	Lesné	Bup ..	25-1-33	0	17	Méningite tuberculeuse
43	Lesné	Fer...	3-2-33	0	17	Méningite tuberculeuse
44	Lesné	Cop ..	3-2-33	0	18	Méningite tuberculeuse
45	Lesné	Tur ..	17-2-33	0	19	Méningite tuberculeuse
46	Lesné	Des ..	11-3-33	0	20	Méningite tuberculeuse

No	Service	Malade	Date	Examen direct	Macro culture	Diagnostic confirmé par la clinique
					jours	
47	Lesné	Raf ..	8-4-33	+	18	Méningite tuberculeuse
48	Lesné	Re ...	10-4-33	+	23	Méningite tuberculeuse
49	Lesné	Dus ..	10-4-33	0	23	Méningite tuberculeuse
50	Lesné	Mah ..	26-4-33	0	21	Méningite tuberculeuse
51	Lesné	Bou ..	26-4-33	0	21	Méningite tuberculeuse
52	Lesné	Bou ..	2-5-33	+	35	Méningite tuberculeuse
53	Lesné	Say ..	6-5-33	0	0	Encéphalite
54	Lesné	Kou ..	11-5-33	+	19	Méningite tuberculeuse
55	Lesné	Mar ..	11-5-33	0	19	Méningite tuberculeuse
56	Lesné	Hof ..	11-5-33	+	28	Méningite tuberculeuse
57	Lesné	Pai ..	11-5-33	0	0	Encéphalite
58	Lesné	Gui ..	6-6-33	+	21	Méningite tuberculeuse
59	Lesné	Bar ..	20-6-33	+	20	Méningite tuberculeuse
60	Lesné	Seg ..	12-10-33	0	23	Méningite tuberculeuse
61	Lesné	Lef ..	8-11-33	+	12	Méningite tuberculeuse
62	Lesné	Lag ..	10-11-33	0	0	Poliomyélite
63	Lesné	Bli ...	20-11-33	0	21	Méningite tuberculeuse
64	Lesné	Rip ..	25-11-33	+	20	Méningite tuberculeuse
65	Lesné	Geo ..	1-2-34	+	19	Méningite tuberculeuse
66	Lesné	Pot ..	1-2-34	0	21	Méningite tuberculeuse
67	Lesné	Lom ..	6-2-34	0	22	Méningite tuberculeuse
68	Lesné	Ple ..	13-2-34	+	19	Méningite tuberculeuse
69	Lesné	Baf ..	17-2-34	0	23	Méningite tuberculeuse
70	Lesné	Sca ...	26-2-34	+	17	Méningite tuberculeuse
71	Lesné	Mar ..	1-3-34	+	27	Méningite tuberculeuse
72	Lesné	Dur ..	1-3-34	+	24	Méningite tuberculeuse
73	Lesné	Mén ..	9-3-34	0	21	Méningite tuberculeuse
74	Lesné	Bor ..	9-3-34	0	0	Méningite à streptocoques
75	Lesné	Cal ..	23-3-34	0	27	Méningite tuberculeuse
76	Lesné	Thi ...	4-4-34	+	31	Méningite tuberculeuse
77	Lesné	Bon ..	17-4-34	0	23	Méningite tuberculeuse
78	Lesné	Hal ..	26-5-34	+	24	Méningite tuberculeuse
79	Lesné	Thé ..	27-8-34	+	22	Méningite tuberculeuse
80	Lesné	Gar ..	7-9-34	+	17	Méningite tuberculeuse
81	Lesné	Alo ...	16-10-34	0	24	Méningite tuberculeuse
82	Lesné	Cas ...	5-11-34	+	22	Méningite tuberculeuse
83	Lesné	Lam ...	29-12-34	0	16	Méningite tuberculeuse
84	Lesné	Gra ..	10-1-35	+	21	Méningite tuberculeuse
85	Lesné	Nar ..	24-1-35	+	22	Méningite tuberculeuse

La lecture de ce tableau nous montre que sur 85 L. C. R. ensemencés, 80 nous ont fourni une culture de bacilles de Koch virulents. Sur ces 80, 42, c'est-à-dire 52 p. 100 ne préentaient pas de bacilles à l'examen direct. Il est intéressant

de remarquer, dans les 5 cas pour lesquels cette méthode a échoué, qu'une enquête menée auprès de M. LESNÉ qui nous avait fait parvenir ces liquides, nous a permis d'établir qu'il s'agissait de syndromes méningés dont l'évolution clinique postérieure a pu écarter le diagnostic de méningite tuberculeuse. Abstraction faite de ces 5 cas, il résulte que la méthode d'ensemencement direct sans traitement préalable nous a donné 100 p. 100 de résultats positifs sur un nombre important de L. C. R., dont 52 p. 100 ne contenaient pas de bacilles à l'examen direct.

D'autre part, au cours de recherches comparatives sur la sensibilité respective des méthodes de culture directe du bacille tuberculeux et de l'inoculation au cobaye, A. SAENZ et nous-même avons eu l'occasion d'insister à maintes reprises sur la grande utilité du raclage précoce des tubes ensemencés pour rechercher les bacilles acido-résistants avant l'apparition de toute colonie macroscopiquement visible.

Recherche de la microculture. — Voici de quelle manière nous procédons. Sur les 6 tubes ensemencés pour chaque échantillon de L. C. R. un premier tube est utilisé dès le 7^e ou 8^e jour. Le raclage consiste à promener aseptiquement l'anse de platine sur toute la surface du milieu de culture ensemencé, en prenant soin de ne pas le blesser, puis on étale le produit ainsi prélevé sur une lame qui est co'orée par la méthode de ZIEHL-NEELSEN. Le tube est ensuite immédiatement replacé à l'étuve. Si cet examen se montre négatif, nous recommençons avec d'autres tubes la même opération, le 11^e, 15^e et 18^e jour, jusqu'à ce que la recherche nous permette de déceler des « microcolonies » constituées par des bacilles acido-résistants isolés ou en amas. Ces raclages, qui constituent de véritables réensemencements, ne nuisent en aucune façon à l'évolution ultérieure de la culture.

Nous avons appliqué cette méthode de diagnostic précoce dans 29 cas de méningite tuberculeuse, dont le liquide

céphalo-rachidien ne contenait pas de bacilles à l'examen direct. En opérant ainsi, nous avons pu déceler des micro-colonies de bacilles acido-résistants, invisibles à l'œil nu à des intervalles de temps indiqués dans le tableau ci-dessous :

No	Service	Micro-culture	Macro-culture	Diffé- rence de temps	Diagnostic confirmé par la clinique
		jours	jours	jours	
1	Debré	7	13	6	Méningite tuberculeuse
2	Abrami	8	15	7	Méningite tuberculeuse
3	Lesné	8	17	9	Méningite tuberculeuse
4	Paisseau	9	21	12	Méningite tuberculeuse
5	Armand Delille	8	13	15	Méningite tuberculeuse
6	Weill Hallé	10	18	8	Méningite tuberculeuse
7	Lesné	10	25	15	Méningite tuberculeuse
8	Lesné	8	21	13	Méningite tuberculeuse
9	X...	11	27	16	Méningite tuberculeuse
10	L. Bernard	8	16	8	Méningite tuberculeuse
11	L. Bernard	12	25	13	Méningite tuberculeuse
12	Lesné	10	19	9	Méningite tuberculeuse
13	Lesné	9	17	8	Méningite tuberculeuse
19	Lesné	17	45	28	Méningite tuberculeuse
23	Abrami	12	27	15	Méningite tuberculeuse
27	Debré	15	40	25	Méningite tuberculeuse
28	Lesné	10	21	11	Méningite tuberculeuse
29	Lesné	15	24	9	Méningite tuberculeuse
34	Debré	13	30	17	Méningite tuberculeuse
36	Lesné	12	22	10	Méningite tuberculeuse
38	Lesné	8	19	11	Méningite tuberculeuse
39	Lesné	8	22	14	Méningite tuberculeuse
41	Lesné	8	18	10	Méningite tuberculeuse
42	Lesné	8	17	9	Méningite tuberculeuse
43	Lesné	11	18	7	Méningite tuberculeuse
44	Lesné	11	17	6	Méningite tuberculeuse
45	Lesné	7	19	12	Méningite tuberculeuse
81	Lesné	7	24	17	Méningite tuberculeuse
83	Lesné	11	16	5	Méningite tuberculeuse

Il ressort de l'étude de ces 29 cas que l'examen du produit de raclage pour déceler des bacilles acido-résistants avant l'apparition de toute colonie macroscopique, nous a donné une réponse positive dans les délais suivants :

Entre le 7 ^e et le 9 ^e jour	dans 50 % des cas
Le 10 ^e jour	» 1 cas
11 ^e »	» 4 »
12 ^e »	» 3 »
13 ^e »	» 1 »
15 ^e »	» 2 »
17 ^e »	» 1 »

Ces colonies sont devenues visibles à l'œil nu :

Le 13 ^e jour	dans 1 cas
15 ^e »	» 1 »
16 ^e »	» 2 »
17 ^e »	» 4 »
18 ^e »	» 3 »
19 ^e »	» 3 »
21 ^e »	» 3 »
22 ^e »	» 2 »
23 ^e »	» 1 »
24 ^e »	» 2 »
25 ^e »	» 2 »
27 ^e »	» 2 »
30 ^e »	» 1 »
40 ^e »	» 1 »
45 ^e »	» 1 »

La recherche systématique de la microculture repiquable nous a permis, dans tous les cas, d'établir un diagnostic précoce dans un temps inférieur de moitié environ à celui qui est nécessaire pour l'obtention de la culture macroscopique.

De plus, pour 11 de ces échantillons où la bacilloscopie directe était négative, nous avons établi des recherches comparatives par inoculation au cobaye : 3 cm³ de liquide étaient ensemencés, et 3 autres inoculés à parties égales dans la cuisse de deux cobayes. L'évolution de la tuberculose chez ces animaux était suivie par des intradermo-réactions à la tuberculine (1/10 de cm³ d'une solution de tuberculine brute au 1/10 en eau physiologique).

Le résultat global de cette expérience a été le suivant : Si la culture macroscopique et l'inoculation nous ont fourni des résultats concordants, par contre, l'examen du produit de raclage nous a permis de déceler des bacilles acido-résistants 8 à 10 jours avant que les animaux inoculés se soient

montrés sensibles à l'intradermo-tuberculation et avant l'apparition de toute adénite inguinale suspecte.

L'ensemble de nos recherches sur cette question nous permet d'affirmer que dans tous les cas où l'on soupçonne l'origine tuberculeuse d'une affection méningée, il faut recourir à la méthode que nous indiquons, qui nous a donné 100 p. 100 de résultats positifs, sur 80 L. C. R. étudiés :

Ensemencer directement, sans centrifugation, le liquide céphalo-rachidien sur 6 à 8 tubes des milieux électifs que nous avons recommandés, et procéder à l'examen systématique des produits de raclage à partir du 7^e jour de séjour à l'étude à 38°. On peut ainsi poser un diagnostic précoce et précis lorsque l'examen direct du culot de centrifugation n'a pas montré de bacilles. Cette méthode est plus rapide et remplace l'inoculation au cobaye. Elle permet également la caractérisation immédiate des types d'origine bovine ou humaine. Sa simplicité et sa précision présentent un réel intérêt dans la pratique courante pour la recherche du bacille de Koch dans le liquide céphalo-rachidien.

Nos résultats ont été confirmés en Italie par BONINO et BRUNI, en Amérique par COWEN et HENDERSON, en France par GRENET, ISAAC GEORGES, MORELLE, et tout dernièrement enfin par PAISSEAU et M^{me} LAQUERRIÈRE.

CULTURE DIRECTE DU BACILLE DE KOCH DANS LES ÉPANCHEMENTS SÉRO-FIBRINEUX D'ORIGINE TUBERCULEUSE DE LA PLÈVRE

Recherche comparative par la culture et inoculation au cobaye

La difficulté de la mise en évidence du bacille tuberculeux dans les épanchements pleuraux séro-fibrineux est connue de tous les microbiologistes.

Bien entendu, nous n'étudierons pas ici les épanchements puriformes où les bacilles sont, en général, très abondants et facilement décelables par les méthodes courantes de culture et par l'inoculation au cobaye.

Il ne sera donc question dans ce travail que des épanchements séro-fibrineux primitifs de la plèvre ou secondaires à un pneumothorax, où les bacilles sont très rares et ne se trouvent presque jamais à l'examen direct.

L'examen direct et l'inoculation au cobaye étaient jusqu'à maintenant les seuls procédés utilisés pour mettre le bacille de Kock en évidence dans ces cas. A l'encontre des liquides puriformes où la culture a été employée couramment et avec succès, elle n'avait donné ici que de faibles résultats. En effet, KARBANSKY, sur 33 liquides de pleurésie communeensemencés sur les milieux à l'œuf glycélinés, n'obtient que 3 résultats positifs certains.

SCHLOSSMANN a appliqué la technique de PETROFF à des liquides de pleurésie franche, et a trouvé 13 résultats positifs sur 15 cas de tuberculose pulmonaire ; mais 40 échantillons provenant de sujets sans signes cliniques de

localisation pulmonaire, n'ont fourni que 8 cultures de bacilles de Koch. Au total, 21 résultats positifs ont été obtenus sur 55 liquides ensemencés.

VEBER, en se servant de la technique de PETROFF et de la pomme de terre glycélinée, sur 16 épanchements pleuraux, tous bacillifères à l'examen direct, et provenant de malades avec pneumothorax artificiel, n'a eu que deux résultats positifs.

D'après RIST et JONESCO, l'ensemencement des exsudats pleuraux de pneumothorax réussit fréquemment surtout lorsqu'il s'agit de liquides récents, mais ces auteurs reconnaissent que certains ne donnent aucune culture.

D'après les différents chercheurs, même avec l'inoculation au cobaye, on arrive à des pourcentages très variables de résultats positifs : CHAUFFARD, 43 p. 100 ; KELSCH et VAILLARD, 10 p. 100 ; NETTER, 30 p. 100 ; EICHHORST, 61 p. 100 ; LE DAMANY, 85 p. 100 ; ASCHOFF, 44 p. 100.

En outre, ces liquides pauci-bacillaires donnent au cobaye une tuberculose particulière, dont l'interprétation exige certaines précautions. Cette forme spéciale de tuberculose étudiée tout particulièrement par A. SAENZ, F. COSTE, et nous-même, et dont une description détaillée sera faite plus loin, se caractérise par l'absence de chancre au point d'inoculation et d'adénite correspondante, et par une évolution lente de la maladie (5 à 6 mois) chez l'animal qui meurt de tuberculose généralisée.

Il est juste de reconnaître qu'il a fallu arriver aux travaux de BEZANÇON et de ses collaborateurs, PHILIBERT et BUC, pour voir de réels progrès se réaliser dans la technique d'ensemencement des épanchements séro-fibrineux.

YEVREM NEDELKOWITCH, qui a fait une étude comparative de la technique de PETROFF et de celle de BUC pour l'ensemencement d'un grand nombre d'exsudats pleuraux ordinaires, arrive aux conclusions suivantes : pourcentage très faible de cultures positives avec la technique de PE-

TROFF, 80 p. 100 de succès par le procédé de Buc. Cette technique repose sur l'emploi d'un milieu à base d'eau peptonée à 2 p. 100 et de glycérine, neutralisé par une solution de phosphate mono-basique de potasse qui permet de réaliser un pH acide nécessaire, comme nous l'avons confirmé, à la réussite de la culture. Ensemencant à parties égales dans ce milieu des exsudats séro-fibrineux clairs ou légèrement louches, Buc a obtenu 57 résultats positifs sur 59 cas de pleurésie. De même, BEZANÇON et Buc, sur 6 liquides provenant de pleurésie à allure primitive, ont réussi à déceler 5 fois le bacille de Kôch par leur procédé.

Nous avons été amenés à appliquer notre méthode d'isolement dans les cas de pleurésie séro-fibrineuse où, comme nous l'avons vu, il est difficile de mettre en évidence le bacille tuberculeux. Pour nous rendre compte de la sensibilité de cette technique, nous avons effectué une étude comparative des mêmes produits par la culture et par l'inoculation au cobaye.

Technique d'ensemencement (A. SAENZ et L. COSTIL). — On prélève aseptiquement 15 à 20 cm³ d'exsudat pleural d'aspect séro-fibrineux, de couleur jaune verdâtre, rendu incoagulable par addition de 2 cm³ d'une solution stérile de citrate de soude à 10 p. 100. On centrifuge le liquide pendant un quart d'heure, puis le culot de centrifugation est divisé en deux parties égales ; la première moitié est émulsionnée dans 2 cm³ d'eau physiologique stérile et inoculée, dans chaque cas, à deux cobayes par voie sous-cutanée. Le reste du culot est dissocié dans un mortier avec une petite quantité de sable stérile et additionné de 1 cm³ d'une solution d'acide sulfurique à 15 p. 100, qu'on laisse en contact pendant 1/4 d'heure. On ajoute une ou deux gouttes de teinture de tournesol (réactif indicateur), et on neutralise avec une solution de soude à 30 p. 100 jusqu'à obtention d'une teinture rougeâtre qui correspond à un pH légèrement acide. L'ensemencement est effectué sur 6 à 8 tubes

de milieu, récemment préparé et de consistance molle, de LOEWENSTEIN au vert malachite ou de PETRAGNANI dans lequel nous avons remplacé la peptone par l'asparagine. Les tubes de culture sont ensuite placés en position horizontale à l'étuve à 38°.

Nous ne ferons état ici que de 15 liquides pleuraux dans lesquels nous n'avons pas trouvé de bacilles à l'examen direct, avant et après homogénéisation. Ces liquides provenaient des services de MM. LÉON BERNARD et CHEVASSU.

Le nombre total de nos ensemencements est consigné dans le tableau suivant :

N ^o	Malade	Date	Examen direct	Macro-culture. Jours	Nombre de colonies	Inoculation		Diagnostic clinique
						Premier cobaye	Deuxième cobaye	
1	Ame.....	3-2-32	—	24	140	—	12 j.	Épanchement pleural séro-fibrineux gauche.
2	Rom.....	11-2-32	—	33	0	0	+ 33 j.	Pleurésie séro-fibrineuse.
3	Deu.....	16-2-32	—	31	110	+ 35 j.	+ 67 j.	Pleurésie séro-fibrineuse primitive. Début brusque.
4	Ges.....	18 2-32	—	25	84	Mort prématurée		Infiltration nodulaire du sommet gauche. Pl. séro-fibrineuse.
5	X.....	4-32	—	21	0	0	0	Pleurésie séro-fibrineuse droite primitive.
6	Cac.....	15-5-34	—	22	0	0	0	Épanchement pleural de la base gauche.
7	Rou.....	17-5-34	—	22	138	+ 36 j.	+ 69 j.	Pleurésie encapsulée avec fibrothorax. Pneumothorax.
8	Cla.....	23-5-34	—		0	0	0	Tuberculose pulmonaire unilatérale. Pneumothorax.
9	Sav.....	28-5-34	—	35	124	+ 32 j.	+ 68 j.	Pleurésie avec congestion pulmonaire.
10	Nau.....	2-6-34	—		0	0	0	Lésions cavitaires droites. Pneumothorax.
11	Sim.....	6-6-34	—	27	94	+ 60 j.	+ 60 j.	Épanchement.
12	Ric.....	11 6-34	—	21	49	0	Mort prématurée	Épanchement gauche ; ponctions et inoculation d'air.
13	Gue.....	13-6 34	—	26	Innombr.	0	Mort prématurée	Tuberculose pulmonaire droit. Pneumothorax. Épanchement.
14	For.....	25-4-34	—	41	2	—	6 j.	Lésions ulcéro-caséuses gauche. Perforation, épanchement.
15	Lev.....	3-7-34	—		0	0	0	Épanchement à gauche. Déplacement du cœur. Épanchement pleural dr. Cœur déplacé. Péricardite.

Ce tableau montre que dans 12 cas, les résultats fournis par la culture et l'inoculation au cobaye ont été concordants. Il s'agit dans 6 cas de liquides pleuraux où l'on n'a pas pu déceler de bacilles tuberculeux ni par l'examen direct, ni par la culture, ni par l'inoculation. Par contre, dans les 6 autres cas, la culture et l'inoculation ont donné un résultat positif. Toutefois, la culture a présenté l'avantage de fournir un diagnostic positif (2 cas, 24 jours ; 1 cas, 26 jours ; 3 cas, 30 à 32 jours) avant que les cobayes inoculés simultanément aient présenté une adénite inguinale suspecte.

Restent encore à considérer trois cas où nous avons obtenu une abondante culture, tandis que les cobayes n'ont donné aucun résultat par suite de leur mort prématurée due à des infections intercurrentes (en 7 et 8 jours pour les cobayes du premier cas, en 12 et 14 jours pour le second, en 22 et 29 pour le troisième).

L'aspect eugonique de la culture et l'étude bactériologique de ces souches ont montré qu'il s'agissait dans tous les cas de bacilles tuberculeux de type humain.

Nous avons voulu dégager du tableau précédent 10 épanchements primitifs séro-fibrineux de la plèvre (cas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 11, 14, 15), pour lesquels, comme nous l'avons déjà dit, la mise en évidence du bacille de Koch présente de réelles difficultés. Même dans ces conditions, l'ensemencement se révèle plus avantageux que l'inoculation au cobaye. En effet, sur un total de 10 cas, la culture a fourni 6 résultats positifs, tandis que l'inoculation n'en a donné que 5. De plus, le diagnostic a été posé par la culture dans un temps beaucoup plus rapide que par l'inoculation.

Ces recherches nous permettent de conclure que :

1^o La culture de 15 liquides séro-fibrineux d'origine pleurale, ne contenant pas de bacilles acido-résistants à l'examen direct, a permis de déceler le bacille de Koch dans 60 p. 100 des cas (9 cas sur 15 étudiés), tandis que l'inocu-

lation simultanée au cobaye n'a fourni des résultats positifs que dans 30 p. 100 des cas (6 sur 15).

2^o La culture de 10 épanchements pleuraux à allure primitive s'est également révélée plus sensible que l'inoculation au cobaye (60 p. 100 de résultats par la culture, 50 p. 100 par l'inoculation). En outre, la culture permet de poser un diagnostic plus rapide que l'inoculation.

La simplicité de cette méthode de culture, la facilité de son emploi et sa sensibilité l'imposent donc pour la recherche systématique du bacille de Koch dans tout épanchement pleural suspect.

RECHERCHES DU BACILLE DE KOCH PAR L'ENSEMENCEMENT DES CRACHATS

Importance de la recherche de la microculture
pour le diagnostic précoce de la tuberculose pulmonaire

Dans les produits pathologiques de la clinique humaine, c'est à partir des crachats qu'ont été pratiqués les premiers essais de culture du bacille de Koch. Pour détruire les microbes de la flore secondaire auxquels il se trouve associé, les chercheurs ont imaginé divers procédés, qui tirent parti de la constitution spéciale de son ectoplasme à base de cires, de graisses et d'acides gras, qui lui confère une remarquable résistance aux antiseptiques et aux agents chimiques (alcalis et acides).

Tout le problème de l'isolement du bacille de Koch en partant des crachats est basé sur deux points essentiels :

1^o Le libérer des microbes d'association secondaire sans entraver en rien sa vitalité.

2^o Le dissocier des mailles muco-purulentes et des leucocytes dans lesquels il se trouve enrobé, pour lui permettre d'être en contact intime avec la surface du milieu, condition indispensable de la réussite de la culture.

Les procédés qui ont été imaginés en vue de remplir cette double condition sont basés sur l'emploi isolé ou combiné des antiseptiques comme l'antiformine, la soude, l'acide chlorhydrique et l'acide sulfurique.

La méthode d'isolement à l'antiformine a été introduite en 1905 par UHLENHUTH et KERSTEN, et employée avec succès par WEBER et DIETERLEN, LIEDEMAN en Allemagne,

STANLEY GRIFFITH en Angleterre. C'est indiscutablement cet auteur qui a la plus grande expérience de cette méthode à laquelle il reste encore aujourd'hui fidèle. La technique préconisée par GRIFFITH est la suivante : Des volumes égaux de crachats et d'antiformine à 15 p. 100 (parties égales d'eau de Javel et de soude à 15 p. 100) sont mélangés et agités soigneusement ; après un contact de 5 à 10 minutes, qui dépend de l'intensité de l'infection secondaire, on centrifuge, on jette le liquide qui surnage, et onensemence le mucus ainsi préparé sur le milieu à l'œuf.

Cette méthode, bien qu'elle permette de liquéfier facilement les crachats, est assez irrégulière en ce qui concerne la purification des germes secondaires, de sorte qu'en dehors de GRIFFITH elle n'est guère employée. En outre, la solution antiseptique doit toujours être utilisée au moment de sa préparation, car elle est très instable.

Dans la technique de PETROFF, des parties égales de crachats et de solution de soude à 4 p. 100 sont agitées vigoureusement et portées à l'étuve à 37° pendant une demi-heure. On agite de nouveau, et on reporte à l'étuve pendant le même temps. On centrifuge durant un quart d'heure, on enlève le liquide surnageant de façon à n'en laisser que 2 à 3 gouttes au-dessus du culot, on neutralise avec 4 à 5 gouttes d'acide chlorhydrique à 4 p. 100 en présence de teinture de tournesol, et onensemence le culot ainsi traité sur 4 à 5 tubes de milieu à l'œuf-violet de gentiane que nous avons décrit précédemment.

PETRAGNANI suit presque exactement cette technique, mais il supprime la centrifugation et neutralise avec une solution d'acide chlorhydrique à 20 p. 100. L'ensemencement du produit se fait dans le milieu de culture à l'œuf-peptone-vert malachite préconisé par cet auteur.

Cependant, un coup d'œil jeté sur l'importante bibliographie consacrée à cette question montre nettement que le plus grand nombre des suffrages est accordé à l'emploi

de l'acide sulfurique. Ce sont les travaux de LOEWENSTEIN et SUMIJSKI qui ont ainsi modifié essentiellement le problème de la culture du bacille de Koch. L'introduction de l'acide sulfurique a permis de supprimer un des plus grands obstacles de la culture et marque une nouvelle étape dans le diagnostic bactériologique de la tuberculose.

Parmi les méthodes d'isolement à l'acide sulfurique, les plus employées en Allemagne sont indiscutablement celles de LOEWENSTEIN et de HOHN.

La technique utilisée par LOEWENSTEIN est la suivante : 2 cm³ de crachats sont mis au contact de 8 cm³ (4 fois son volume) d'une solution d'acide sulfurique à 15 p. 100 pendant 10 minutes ; on centrifuge ; on rejette le liquide surnageant, on lave ensuite le culot avec de l'eau physiologique, et après nouvelle centrifugation on l'ensemence sur plusieurs tubes de milieu de LOEWENSTEIN.

HOHN ajoute à une quantité quelconque de crachats, 10 cm³ d'une solution d'acide sulfurique à 10 ou 12 p. 100 (crachats très infectés), laisse en contact pendant 20 minutes en agitant fréquemment, et, après une centrifugation de 5 minutes, ensemence le culot sur son milieu à l'œuf-hématine.

La sensibilité de ces deux méthodes a été unanimement reconnue et confirmée dans les nombreux travaux qui ont été mentionnés dans l'historique de la culture ; cependant elles présentaient comme inconvénients les centrifugations préalables à l'ensemencement qui sont indiscutablement une complication pour une technique destinée à être d'un usage courant.

Les résultats de l'étude comparative de la méthode que nous avons préconisée avec celle de HOHN, qui reste l'une des plus sensibles à l'heure actuelle, nous ont démontré que nous étions parvenus pleinement au but que nous nous étions proposé.

TECHNIQUE DE A. SAENZ et L. COSTIL.

Lorsque les crachats ont un aspect nummulaire, nous les lavons préalablement à l'eau physiologique. Nous effectuons l'homogénéisation du mucus en dissociant dans un mortier 2 cm³ de crachats avec une petite quantité de sable stérile ; ce broyage ne doit être suspendu que lorsque le produit prend un aspect uniforme, ce qui demande environ 5 minutes ; ce premier temps est fondamental pour permettre à l'acide d'exercer une action liquéfiante totale. Nous traitons ensuite par 2 cm³ d'une solution d'acide sulfurique à 15 p. 100 (en volume) pendant une demi-heure lorsque l'infection paraît être intense. On ajoute alors une ou deux gouttes de teinture de tournesol (réactif indicateur), et on neutralise avec une solution de soude à 30 p. 100 jusqu'à obtention d'un virage au lilas (limite de neutralité à $pH = 7,2$). On examine alors une parcelle du produit ainsi homogénéisé après coloration par la méthode de ZIEHL, et on l'ensemence en totalité à raison de 0,5 cm³ par tube. On peut aussi en réserver la moitié pour l'inoculation au cobaye lorsqu'on désire faire des épreuves comparatives. L'ensemencement est effectué sur 8 tubes de milieu de LOEWENSTEIN au vert malachite ou de PETRAGNANI dans lequel nous substituons l'asparagine à la peptone.

Quand la quantité de bactéries encapsulées n'est pas très importante, on peut employer une solution d'acide sulfurique à 10 p. 100 et neutraliser avec une solution de soude à 20 p. 100.

Pour nous rendre compte de la sensibilité de cette méthode, nous avons commencé par l'appliquer aux crachats de tuberculeux avérés, qui présentaient des bacilles acido-résistants à l'examen direct. Nous avons ainsi pratiqué l'ensemencement de 73 crachats, dont les résultats respectifs sont consignés dans le tableau ci-dessous.

Ces crachats provenaient des services de MM. LÉON BERNARD, ROBERT DEBRÉ, WEILL HALLÉ et ARMAND-DELILLE.

N ^o	Malade	Date	Exa- men direct	Macro- culture	Diagnostic
				jours	
1	Fer....	26-2-31	+	15	Tuberculose pulmonaire et laryngée, poussées bacillémiques.
2	Bas ...	21-2-31	+	18	Tuberculose caséreuse chronique bilatérale.
3	Lor ...	29-2-31	++	19	Tuberculose pulmonaire cavitaires bilatérale.
4	Ese ...	29-2-31	++	13	Caverne du sommet d. oit.
5	Ter....	29-2-31	+	21	Broncho-pneumonie ulcéro-caséreuse en régression.
6	Jud. ...	4-3-31	+	24	Broncho-pneumonie ulcéro-caséreuse chronique.
7	Pap ...	6-3-31	++	20	Pneumonie ulcéro-caséreuse aiguë.
8	Gal....	7-3-31	+++	12	Tuberculose pulmonaire et laryngée très avancée.
9	Mar ...	9-3-31	+	21	Tuberculose septicémique
10	Lam....	10-4-31	++	25	Tuberculose pulmonaire et laryngée septicémique.
11	Far ...	12-4-31	+	22	Tuberculose fibro-caséreuse bilatérale.
12	Lor ...	19-4-31	+	17	Pneumonie ulcéro-caséreuse. Empyème.
13	Imp ...	19-4-31	+	16	Tuberculose ulcéro-caséreuse en régression.
14	Amb ..	21-4-31	+	12	Granulie chronique.
15	Bay ...	24-4-31	+	27	Tuberculose fibro-caséreuse bilatérale.
16	Pap ...	7-6-31	+	21	Granulie.
17	Via....	7-6-31	+	18	Tuberculose pulmonaire et laryngée chronique.
18	Cot....	7-6-31	+	19	Tuberculose ulcéro-caséreuse bilatérale.
19	Her ...	26-6-31	+	21	Pneumonie caséreuse.
20	Dou ...	26-6-31	+	23	Tuberculose fibro-caséreuse.
21	Val....	26-6-31	+++	14	Pneumonie ulcéro-caséreuse.
22	Nol ...	26-6-31	+	19	Tuberculose pulmonaire et laryngée.
23	Ros ...	27-6-31	+	30	Granulie chronique.
24	Mar ...	29-6-31	+	20	Broncho-pneumonie tuberculeuse bilatérale en régression.
25	Sim ...	29-6-31	++	17	Tuberculose pulmonaire et laryngée septicémique.
26	Sau ...	29-6-31	+	19	Granulie chronique.
27	Tho ...	7-7-31	+++	11	Tuberculose bilatérale septicémique.
28	Gar ...	7-7-31	+	16	Tuberculose cavitaires du sommet droit.
29	Cam ...	7-7-31	++	22	Granulie chronique.
30	Cab ...	10-7-31	+	26	Tuberculose fibro-caséreuse du poumon droit.
31	Anj ...	10-7-31	+++	14	Granulie chronique bilatérale.
32	Dan ...	10-7-31	+	21	Tuberculose fibro-caséreuse bilatérale.
33	Boo ...	10-7-31	+	16	Granulie chronique en régression.
34	Cor....	5-10-31	+	23	Pneumonie caséreuse en régression.
35	Gua ...	5-10-31	+	16	Tuberculose ulcéro-caséreuse du poumon droit.

N ^o	Malade	Date	Exa- men direct	Macro- culture	Diagnostic
				jours	
36	Gom...	5-10-31	+	27	Tuberculose ulcéro-caséeuse. Cavitaire.
37	Car....	12-10-31	+	17	Tuberculose fibro-caséeuse en régression.
38	Bre....	12-10-31	+	21	Granulie chronique.
39	Fle....	12-10-31	++	12	Pneumonie caséeuse bilatérale.
40	Mer ...	15-10-31	+	21	Tuberculose fibro-caséeuse.
41	Der ...	15-10-31	+	28	Tuberculose septicémique congestive.
42	Mor ...	19-10-31	+++	13	Tuberculose cavitaire et laryngée.
43	Pin....	19-10-31	+	23	Pneumonie ulcéro-caséeuse aiguë.
44	Saf ...	23-10-31	+	26	Tuberculose cavitaire bilatérale.
45	Fit ...	23-10-31	+	17	Pneumonie ulcéro-caséeuse bilatérale.
46	Mai ...	24-10-31	+	35	Tuberculose ulcéro-caséeuse des 2 bases.
47	Arg ...	27-10-31	++	13	Granulie bilatérale. Caverne droite.
48	Til	29-10-31	+	18	Tuberculose septicémique, laryngée. Ca- vitaire.
49	Fra ...	29-10-31	+++	16	Tuberculose septicémique laryngée. Ca- vitaire.
50	Gir....	4-11-31	+	22	Infiltration du sommet droit. Adéno- pathie trachéo-bronchique.
51	Rod ..	3-12-31	+	25	Tuberculose fibro-caséeuse.
52	Rol ...	2-2-32	+	10	Granulie chronique bilatérale.
53	Noi ...	4-3-32	+	27	Tuberculose fibro-caséeuse en régression.
54	Gui ...	4-3-32	+	21	Tuberculose cavitaire droite. Pneumo- thorax.
55	Sei	4-3-32	+	15	Infiltration diffuse. Caverne du sommet droit.
56	Ale....	25-11-33	+	17	Tuberculose cavitaire.
57	Val....	25-11-33	+	15	Tuberculose cavitaire.
58	Vau ...	25-11-33	+	22	Tuberculose cavitaire.
59	Mas ...	26-11-33	+	16	Tuberculose cavitaire.
60	Boi ...	26-11-33	+	27	Tuberculose cavitaire.
61	Dan ...	28-11-33	+	23	Tuberculose cavitaire.
62	Mal ...	29-11-33	+	28	Tuberculose cavitaire.
63	Rev ...	29-11-33	+	12	Tuberculose cavitaire.
64	Lef ...	1-12-33	+	16	Tuberculose cavitaire.
65	Ton ...	1-12-33	+++	13	Tuberculose cavitaire.
66	Ver ...	1-12-33	+++	10	Tuberculose cavitaire.
67	Ros ...	1-13-33	+	27	Tuberculose cavitaire.
68	Rom ...	1-12-33	+++	25	Tuberculose cavitaire.
69	Tur ...	6-12-33	+++	21	Tuberculose cavitaire.
70	Voi....	6-12-33	+	21	Tuberculose cavitaire.
71	Dub ...	6-12-33	+	30	Tuberculose cavitaire.
72	Bou ...	6-12-33	+	21	Tuberculose cavitaire.
73	Bon ...	6-12-33	+	19	Tuberculose cavitaire.

Cette expérience nous a nettement fixé sur la valeur de la méthode que nous avons préconisée. En effet, sur

73 crachatsensemencés, nous avons réussi dans tous les cas à mettre en évidence le bacille par la culture. Une première conclusion s'impose : dans les crachats bacillifères la culture peut remplacer l'inoculation au cobaye (100 p. 100 de résultats positifs sur 73 crachatsensemencés).

Sur un total de 97 échantillons qui nous ont fourni une culture de type humain, nous nous sommes efforcé d'établir un diagnostic précoce de tuberculose pulmonaire pour 23 crachats qui ne montraient pas de bacilles à l'examen direct, avant ou après homogénéisation. Dans ce but, nous avons effectué un raclage précoce des tubesensemencés avant l'apparition de toute colonie macroscopique. La technique employée est identique à celle que nous avons exposée pour la recherche de la microculture repiquable dans les liquides céphalo-rachidiens.

Voici les résultats obtenus au cours de cette recherche :

N°	Malade	Date	Examen direct	Micro culture	Macro culture	Gain de temps	Diagnostic clinique
				jours	jours	jours	
1	Cal ..	3-2-32	0	8	18	10	Pneumothorax depuis 6 mois.
2	Mac ..	3-2-32	0	9	16	7	Bronchite unique chez un vieillard.
3	Che ..	12-2-32	0	0	18	9	Tuberculose fibreuse. Caverne du sommet droit.
4	Rod ..	17-2-32	0	8	19	11	Tuberculose uni-latérale, pneumothorax.
5	Fer...	17-2-32	0	10	18	8	Cavitaire. Pneumothorax.
6	Cha ..	12-3-32	0	12	25	13	Lésions fibreuses bilatérales diffuses.
7	Hem ..	12-3-32	0	7	16	9	Hémoptysies. Infiltration diffuse du sommet gauche.
8	Chi ..	12-3-32	0	10	32	22	Pleurésie séro-fibrineuse. Scissurite.
9	Bel...	12-3-32	0	12	25	13	Tuberculose fibreuse. Poussée évolutive.
10	Mot ..	12-3-32	0	8	19	11	Bronchite. Pleurésie séro-fibrineuse.
11	Bro ..	26-3-32	0	9	18	9	Broncho-pneumonie tuberculeuse micronodulaire.
12	Ros ..	3-4-32	0	8	19	11	Infiltration périlobaire. Adénopathie trachéo-bronchique.
13	Gir. ..	7-4-32	0	10	21	11	Tuberculose fibro-caséeuse en évolution.
14	Sal ..	7-4-32	0	7	18	11	Infiltration du sommet gauche.
15	Cot...	18-5-32	0	14	35	21	Tuberculose fibro-cavitaire chronique.
16	Sil ...	18-5-32	0	8	16	8	Poussée évolutive.
17	Per...	3-6-32	0	14	22	8	Caverne du sommet.
18	Les...	9-6-32	0	10	21	11	Tuberculose fibro-caséeuse évolutive.
19	Mic...	13-6-32	0	14	25	11	Hémoptysies. Caverne du sommet gauche.
20	Bla...	2-7-32	0	8	16	8	Tuberculose bilatérale. Pneumothorax.
21	Rib...	11-7-32	0	12	32	20	Caverne du sommet gauche.
22	Cecl...	21-7-32	0	10	18	8	Infiltration de la base du poumon droit.
23	Car...	31-7-32	0	9	18	9	Dilatation bronchique.
							Tuberculose fibro-caséeuse droite. Pneumothorax.

En premier lieu, ces résultats démontrent que dans 70 p. 100 des cas, la recherche de la microculture a permis de poser un diagnostic de tuberculose 7 à 10 jours après

l'ensemencement, et pour les autres cas, entre le 10^e et le 13^e jour, c'est-à-dire dans un délai de temps inférieur de moitié à celui qui est nécessaire à l'apparition de la culture macroscopique.

En second lieu, nous avons comparé pour 7 d'entre eux, les résultats positifs fournis respectivement par la microculture et l'inoculation au cobaye. Il en résulte que la recherche de la microculture présente l'avantage d'avoir fourni un diagnostic 9 à 12 jours avant que les cobayes inoculés n'aient réagi à l'intradermo-réaction tuberculinique ou aient présenté une adénite inguinale suspecte.

De plus, il est tout particulièrement intéressant de développer le cas n^o 15, qui n'a pas tuberculisé le cobaye et a donné une culture macroscopique 35 jours après l'ensemencement. Le diagnostic avait pu être posé dès le 14^e jour, grâce à la recherche de la microculture. L'étude comparative par la culture et l'inoculation au cobaye a été pratiquée de la façon suivante : 4 cm³ de crachats traités par l'acide sulfurique et neutralisés par la soude ont été divisés en deux parties. La première moitié a étéensemencée sur 8 tubes de milieu à l'œuf-asparagine-vert malachite. Le reste a été inoculé en parties égales à deux cobayes par la voie sous-cutanée. Un de ces animaux est mort de maladie intercurrente le 9^e jour ; l'autopsie ainsi que les frottis des divers organes n'ont révélé ni lésion tuberculeuse, ni bacilles acido-résistants. L'autre cobaye a répondu négativement à l'intradermo-tuberculation effectuée le 15^e et le 25^e jour, et il est mort de péritonite pneumococcique, 29 jours après l'inoculation, sans présenter de lésion tuberculeuse. Le broyage des ganglions inguinaux et d'un morceau de rate a été inoculé après traitement par l'acide à 2 cobayes qui, dans la suite, ne sont pas devenus tuberculeux. Dans ce cas la culture s'est donc montrée plus sensible que l'inoculation au cobaye.

Comme nous le verrons plus loin, nous avons eu l'occasion

d'observer des cas semblables au cours de nos recherches sur les sédiments urinaires, les liquides pleuraux et les liquides de lavage d'estomac. A la fin de ce travail, nous envisagerons la discussion des résultats donnés par la culture et par l'inoculation au cobaye, quand il s'agit de produits paucibacillaires.

Des faits observés au cours de ce chapitre se dégagent les conclusions suivantes :

1^o L'application de la méthode que nous avons préconisée pour l'isolement du bacille tuberculeux dans les crachats positifs à l'examen direct s'est révélée aussi sensible que l'inoculation au cobaye (100 p. 100 de résultats positifs sur 73 échantillons étudiés).

2^o En conséquence, l'ensemencement suffit au point de vue pratique et remplace l'inoculation au cobaye.

3^o Dans ce cas, la culture offre l'avantage de fournir un résultat plus rapide que l'inoculation, et met à l'abri des maladies intercurrentes du cobaye. En outre, pour un praticien exercé, l'aspect de la culture permet l'identification immédiate du type de bacille isolé.

4^o Quand il s'agit de crachats qui ne présentent pas de bacilles à l'examen direct, avant ou après homogénéisation, on peut arriver, en procédant à l'examen systématique du produit d'ensemencement par raclage des tubes à partir du 7^e jour, à poser un diagnostic précoce et précis dans un temps inférieur de moitié à celui qui est nécessaire à l'apparition des colonies macroscopiques.

5^o Dans ce cas, la culture offre, grâce à la recherche systématique des microcolonies, l'avantage d'établir un diagnostic 9 à 12 jours avant que les cobayes inoculés aient réagi à l'intradermo-réaction tuberculinique ou aient présenté une adénite inguinale suspecte.

6^o Dans les crachats négatifs à l'examen direct, il est cependant indispensable de pratiquer simultanément la culture et l'inoculation au cobaye. En employant un seul

de ces procédés, on risque, comme pour le cas n^o 15, de poser un diagnostic inexact.

En résumé, dans tous les cas où l'on a quelques raisons de soupçonner la nature tuberculeuse des crachats, il faut procéder de la façon suivante :

1^o Si les crachats présentent des bacilles à l'examen direct, la culture suffit et remplace avantageusement l'inoculation au cobaye.

La simplicité de la culture, sa précision, l'économie de temps et de frais qu'elle procure la font employer dans ce cas de préférence aux autres méthodes de diagnostic.

2^o Si les crachats sont négatifs à l'examen direct, on pratiquera simultanément la culture et l'inoculation au cobaye, chacun de ces procédés pouvant donner séparément des résultats discordants dans les crachats paucibacillaires.

DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DE LA TUBERCULOSE RÉNALE

Utilité de la recherche systématique de la microculture pour poser un diagnostic précoce

Les recherches récentes, concernant la mise en évidence du bacille de Koch dans la tuberculose rénale, établissent d'une façon incontestable l'extrême sensibilité de la culture, qui se révèle très supérieure à l'examen direct, et même fréquemment à l'inoculation du sédiment urinaire au cobaye.

Ainsi, HORN, sur 20 échantillons d'urine appartenant à des malades atteints de tuberculose rénale, n'a réussi que 7 fois à mettre en évidence le bacille de Koch. En revanche, il obtient 20 résultats positifs (100 p. 100) par l'ensemencement, plus sensible donc que l'examen microscopique direct dans 65 p. 100 des cas.

De leur côté, FISCHER et URGOITI, dans 86 cas de tuberculose rénale, ont appliqué la technique de LOEWENSTEIN pour une étude comparative entre la sensibilité du milieu de culture et l'inoculation au cobaye. Chaque sédiment urinaire préalablement traité par l'acide était divisé en deux parties égales. Une moitié était destinée à la culture sur milieu de LOEWENSTEIN, et l'autre réservée pour l'inoculation. Les résultats furent les suivants : une culture de bacilles de Koch a été obtenue dans 35 cas, tandis que les mêmes échantillons n'ont tuberculisé le cobaye que 30 fois. La culture a fourni des résultats positifs dans 5 cas où l'inoculation au cobaye était négative.

Dans 10 cas où le sédiment urinaire présentait des bacilles à l'examen microscopique, BRECHMANN a réussi à obtenir un développement de bacilles humains ; de plus la culture

a été positive dans 15 cas sur 51 où l'examen direct n'avait pas montré de bacilles.

De même, VAN RIEMSDIGK a obtenu par la méthode de HOHN 14 résultats positifs sur 25 sédiments urinairesensemencés dont 9 seulement présentaient des bacilles à l'examen direct. En outre, dans un cas où l'inoculation au cobaye était négative, l'ensemencement a fourni une culture de bacilles de Koch.

En Amérique, NORTON, THOMAS et BROOM ont comparé les résultats obtenus par la culture et l'inoculation au cobaye dans 94 cas ; ils arrivent aux constatations suivantes : dans 13 cas, la culture et le cobaye ont fourni des résultats positifs concordants ; mais dans 8 cas, la culture s'est montrée positive alors que le cobaye était négatif. D'après ces auteurs, le cas contraire, cobaye positif et culture négative, n'a jamais été observé.

VON HUTH et LIEBERTHAL ont eu l'occasion d'étudier 300 cas de tuberculose génito-urinaire dans leur clinique d'Illyes à Budapest. Ils ont réussi à déceler le bacille de Koch par la culture après traitement par l'acide sulfurique dans 50 cas négatifs à l'examen direct. De plus, dans 10 cas où l'épreuve au cobaye s'est montrée négative, les ensemencements dans les milieux à l'œuf-hématine ont fourni des cultures de bacilles de Koch.

Enfin, DIMTZA, qui entreprit l'étude de 114 cas de tuberculose rénale, affirme que l'examen direct s'est montré positif dans 72 p. 100 des cas, le cobaye dans 94 p. 100 et la culture dans 98 p. 100. Dans 4 cas, où l'examen microscopique est demeuré négatif, la culture a donné des résultats positifs.

Comme nous le verrons plus loin, ces résultats concordent avec ceux que A. SAENZ, D. EISENDRATH et nous-même avons obtenus par la méthode d'ensemencement que nous avons préconisée pour déceler le bacille de Koch dans la tuberculose rénale.

Voici la technique que nous avons adoptée : s'il s'agit

d'urines claires, on en centrifuge environ 300 cm³, mais si elles sont troubles ou sanguinolentes, 40 à 50 cm³ suffisent. On peut aussi se servir pour cette recherche du sédiment obtenu par simple décantation de 500 cm³ d'urine laissée 24 heures à la température du laboratoire. Le culot ou le sédiment ainsi obtenu est aspiré dans une pipette graduée et déposé dans un mortier stérile, puis broyé jusqu'à homogénéisation complète avec du sable stérile. Pour arriver à ce résultat, il suffit en général de 3 à 5 minutes de broyage. Nous traitons ensuite pendant 20 minutes à une demi-heure par un volume égal d'acide sulfurique à 15 p. 100 si l'infection secondaire paraît intense ; lorsque la flore microbienne est peu abondante, l'action de l'acide sulfurique à une concentration de 10 p. 100 durant 15 à 20 minutes suffit. Nous ajoutons ensuite quelques gouttes de teinture de tournesol (réactif indicateur), et nous neutralisons avec une solution de soude à 30 ou 20 p. 100 (suivant la concentration de l'acide) jusqu'à ce que le mélange arrive à une couleur lilas légèrement rougeâtre, qui correspond à un pH oscillant entre 6,8 et 7,2.

Nous ensemençons la totalité du culot ainsi préparé à la surface de 6 à 8 tubes du milieu à l'œuf-asparagine-vert malachite que nous avons recommandé

Pour les recherches comparatives entre la culture et l'inoculation au cobaye, on divise le culot ainsi traité en deux parties égales, l'une destinée à la culture, l'autre à l'inoculation.

Cette étude bactériologique et clinique, effectuée avec la collaboration de D. EISENDRATH, comprend au total 57 cas suspects de tuberculose rénale provenant du service du professeur LEGUEU. Sur les 57 échantillons d'urine que nous avons étudiés, 27 ont donné un résultat négatif, et 30 un résultat positif. Les 27 premiers cas négatifs à la fois par l'examen direct, la culture et l'inoculation au cobaye sont indiqués dans le tableau suivant :

TABLEAU I

Examen direct négatif. Culture négative. Cobayes négatifs.

Número des cas	Examen direct	Culture	Cobaye	Diagnostic
4	0	—		Néphrectomie pour tuberculose rénale en septembre 1930. Traité par rayons ultra-violets. Culture pratiquée en janvier 1932.
9	0	—	—	Hémiplégie. Urine très trouble.
10	0	—	—	Néphrectomie pour tuberculose rénale confirmée par pièce (26 novembre 1932). Culture pratiquée le 26 mars 1932.
11	0	—		Colibacillose ; suspecte de tuberculose.
17	0	—	—	Colibacillose ; suspecte de tuberculose.
18	0	—	—	Néphrectomie pour tuberculose rénale le 15 février 1932. Pièce : aucune trace de lésion rénale. Culture pratiquée le 5 février 1932.
19	0	—		Néphrectomie pour tuberculose rénale. Pièce : Deux tiers supérieurs du rein presque totalement transformés en cavités caséo-purulentes. Culture pratiquée après néphrectomie.
20	0	—		Diagnostic : tuberculose rénale droite. Pas encore opéré (août 1932).
21	0	—		Suspect tuberculose rénale. Pas encore opéré (août 1932).
24	0	—		Néphrectomie pour tuberculose rénale le 18 avril 1932 confirmée par pièce. Culture pratiquée après néphrectomie.
35	0	—		Colibacillose. Suspecte de tuberculose rénale.
36	0	—		Colibacillose. Suspecte de tuberculose rénale.
37	0	—		Enfant avec néphrite chronique.
38	0	—		Hématurie. Néphrite subaiguë.
41	0	—		Enfant avec pyurie et calcul vésical.
42	0	—		Néphrectomie le 11 mai 1932 pour tuberculose rénale. Pièce montre forme inhabituelle. Pas de bacilles de Koch par coloration des tissus. Culture pratiquée le 29 avril 1932.
43	0	—		Néphrectomie pour tuberculose rénale le 18 juin 1932. Culture pratiquée le 8 juin 1932.
47	0	—		Néphrite amyloïdique.
48	0	—		Pyurie. Suspect de tuberculose.
49	0	—		Néphrose lipodique.
50	0	—		Tuberculose pulmonaire. Epididymite tuberculeuse. Vésiculite séminale tuberculeuse.
51	0	—		Colibacillose. Suspecte de tuberculose rénale.
52	0	—		Epididymite tuberculeuse.
56	0	—		Mal de Pott récent. Sinus suspect, tuberculose du rein droit.
57	0	—		Néphrectomie pour tuberculose rénale le 25 juin 1932. Plaie restée ouverte. Culture pratiquée le 12 août 1932.
58	0	—		Tuberculose pulmonaire. Ostéomyélite. Bras gauche tuberculeux (10 août 1932). Néphrectomie pour tuberculose rénale. Culture pratiquée le 12 août 1932.
59	0	—		Hématurie rein gauche. Suspecte de tuberculose rénale.

Parmi les 30 cas positifs, 20 ont révélé des bacilles de Koch par l'examen direct et par la culture, comme on peut le constater dans le tableau II.

TABLEAU II. — *Examen direct et culture positifs.*

Numéros des cas	Microcultures	Macroculures	Diagnostic
1	16	27	Néphrectomie le 13 novembre 1931 pour tuberculose rénale confirmée par la pièce.
2	17	35	Tuberculose rénale bilatérale.
8	12	19	Néphrectomie pour tuberculose rénale. Pièce ; partie supérieure du rein presque exclue. Diagnostic : tuberculose ulcéro-caséeuse.
6	10	17	Néphrectomie pour tuberculose rénale, juillet 1931 ; urines restent troubles.
7	11	18	Diagnostic : tuberculose rénale. Pas encore opéré (août 1932).
12	10	18	Néphrectomie pour tuberculose rénale (28 janvier 1932). Confirmée par pièce.
13	9	18	Néphrectomie pour tuberculose rénale (1 ^{re} février 1932). Confirmée par pièce.
14	16	22	Néphrectomie pour tuberculose rénale. Confirmée par pièce.
15	12	21	Diagnostic : tuberculose rénale. Pas encore opéré (août 1932).
16	9	15	Opéré en mai 1931 pour épидидymite tuberculeuse. Suspect de tuberculose rénale mais pas encore opéré (août 1932).
25	10	17	Enfant avec incontinence. Suspect de tuberculose rénale. Néphrectomie le 13 mai 1932.
26	18	25	Enfant colibacillose. Suspect de tuberculose rénale.
29	9	19	Suspect de tuberculose rénale.
30	9	19	Néphrectomie pour tuberculose rénale en 1927. Persistance d'une cystite.
31	9	19	Néphrectomie pour tuberculose rénale confirmée par pièce (18 mai 1932).
32	8	20	Néphrectomie en 1930 pour tuberculose rénale. Urine reste trouble.
39	8	16	Suspect de tuberculose rénale.
40	8	16	Diagnostic : tuberculose rénale, par M. Chabanier.
46	8	15	Tuberculose rénale bilatérale.
55	8	15	Epididymite tuberculeuse. Vésiculite séminale tuberculeuse. Suspect de tuberculose rénale. Abscès froid costal.

Les 10 autres cas qui ne présentaient pas de bacilles acido-résistants à l'examen direct ont donné lieu à des cultures, comme nous l'indique le tableau III. Nous faisons remarquer que les résultats de l'examen direct obtenus dans notre laboratoire concordent avec ceux observés à la clinique de l'hôpital Necker.

TABLEAU III. — *Examen direct négatif. Culture positive.*

Numéros des cas	Microcultures	Macroculures	Diagnostic
3	0	27	Néphrectomie pour tuberculose rénale en 1929. Fréquence persistante.
5	12	18	Diagnostic : tuberculose rénale. Non opéré.
22	10	18	Néphrectomie pour tuberculose rénale confirmée par pièce. Diagnostic : tuberculose ulcéro-caséeuse localisée (1932).
23	30	60	Néphrectomie en 1928. Hémoptysie en 1932 (tuberculose pulmonaire avancée). Mort. Pas d'autopsie.
34	8	36	La pièce anatomique a montré une hydronéphrose tuberculeuse.
33	18	36	Néphrectomie en juillet 1931. Urine reste trouble.
45	16	23	Néphrectomie pour tuberculose rénale en 1926. Fréquence persistante.
53	20	28	Néphrectomie pour tuberculose rénale le 9 août 1932. Pièce non gardée.
54	8	20	Néphrectomie pour tuberculose rénale le 28 juillet 1932.
60	18	26	Suspect de tuberculose rénale.

Dans les 30 cas qui ont fourni une culture, le raclage des tubes ensemencés fut pratiqué (1) avant l'apparition de toute colonie macroscopiquement visible pour la recherche de la microculture repiquable comme moyen pratique d'établir un diagnostic précoce. Nous avons ainsi obtenu, sauf pour le cas N° 3, où le raclage n'a pas été fait, des microcolonies de bacilles acido-résistants dans les délais indiqués ci-dessous:

(1) Consulter pour cette technique le chapitre relatif aux L. C. R.

A. — Délai précédant l'apparition de la microcolonie :

Jours	Nombre de cas
8.....	7
9.....	5
10.....	4
11.....	1
12.....	3
16.....	3
17.....	1
18.....	3
20.....	1
30.....	1

B. — Délai précédant l'apparition de la macrocolonie.

Jours	Nombre de cas
15.....	3
16.....	2
17.....	2
18.....	5
19.....	4
20.....	1
21.....	1
22.....	1
23.....	1
25.....	1
26.....	1
27.....	2
29.....	1
35.....	1
36.....	2
60.....	1

Il ressort très nettement de la lecture de ce tableau que le procédé de recherche de la microculture nous a permis de poser un diagnostic dans un délai inférieur de moitié à celui qui est nécessaire à l'apparition des macrocultures.

De plus, il est intéressant de noter que, dans 5 cas où l'inoculation au cobaye a fourni un résultat positif concordant, l'examen du raclage des microcultures a été aussi positif huit jours avant que le cobaye inoculé ait réagi à l'intradermo-réaction à la tuberculine ou qu'il ait présenté une adénite inguinale suspecte.

Ces résultats ont été confirmés par M. BONINO de Turin. Cet auteur s'est servi de notre méthode d'ensemencement

pour étudier 47 cas de tuberculose rénale diagnostiquée cliniquement.

Sur 40 cas où l'ensemencement du sédiment urinaire a donné une culture positive, M. BONINO a pu mettre en évidence par le raclage des tubes la présence de microcolonies entre les 7^e et 17^e jours consécutifs à l'ensemencement. Cet auteur conclut ainsi : « On peut affirmer que cette méthode de recherche permet de faire un diagnostic étiologique rapide et sûr dans la totalité des cas. D'autre part, dans certains cas assez difficiles, elle fournit à l'urologiste un moyen indispensable pour éviter la cause des erreurs de diagnostic, et par suite de thérapeutique. Ces faits ont été démontrés dans trois cas où le diagnostic clinique de tuberculose avait été posé, et où on a pu affirmer la nature spécifique de la lésion, grâce à la recherche répétée des microcultures. »

Au cours des recherches effectuées à l'Institut Pasteur, des résultats discordants ont été constatés à deux reprises par l'examen comparatif entre la culture et l'inoculation au cobaye. La culture a donné lieu à un développement de rares colonies, alors que le cobaye, dans les mêmes délais, n'a pu donner aucune réponse.

Voici le détail d'un de ces cas : le culot de centrifugation de 50 cm³ d'une urine suspecte, préalablement traité par l'acide sulfurique et dilué en sérum physiologique (6 cm³), est divisé en deux parties : la première (3 cm³) est ensemencée sur milieu à l'œuf-asparagine-vert malachite, la deuxième (3 cm³) est inoculée le même jour à deux cobayes par injection sous-cutanée. Un de ces cobayes meurt de maladie intercurrente 14 jours après l'inoculation ; son autopsie ne révèle aucune lésion de nature tuberculeuse. L'autre cobaye, mort également de maladie intercurrente dans un délai de 34 jours, avait subi 4 fois l'intradermo-réaction à la tuberculine avec résultat négatif ; à l'autopsie il ne montrait aucune lésion suspecte de tuberculose. Parmi

les tubes ensemencés avec le même culot, la recherche de la microculture a été positive dans un délai de 30 jours et deux colonies macroscopiques ont apparu 32 jours après l'ensemencement. Dans ce cas, la culture s'est donc montrée sensiblement supérieure à l'inoculation au cobaye, en raison des maladies intercurrentes de cet animal.

Cette recherche, dont l'étude clinique a été faite par D. EISENDRATH, présente un intérêt urologique particulier, car elle a démontré qu'il existe un lien très étroit entre l'élimination des bacilles tuberculeux et les lésions pathologiques du rein. En effet, lorsqu'il s'agit d'une tuberculose rénale où le foyer est presque exclu, c'est-à-dire quand la communication avec le bassinet est très petite, on ne trouve les bacilles tuberculeux que d'une façon intermittente.

Par exemple, l'examen de l'urine des cas 8, 19, 22, 24 et 60 donne des résultats alternativement positifs et négatifs. Dans le cas 8, la culture et l'inoculation au cobaye ont été positives le 6 janvier 1932, mais le 29 décembre 1931 l'examen direct était négatif. Le 30 décembre 1931 on n'a trouvé que quelques bacilles tuberculeux à l'examen direct. La pièce montrait la partie supérieure du rein presque exclue.

Dans le cas 19, l'examen direct était positif (LEGUEU) le 23 mars 1932 et négatif le 8 avril. L'examen direct, la culture et l'inoculation au cobaye à l'Institut Pasteur étaient négatifs le même jour ; la pièce montrait une oblitération des voies excrétrices.

Dans le cas 22, l'examen direct était négatif le 25 janvier 1932, mais le 8 avril on a trouvé quelques bacilles tuberculeux. Le 18 avril, l'examen à l'Institut Pasteur était négatif, mais la culture fut positive. La lésion pathologique était une tuberculose ulcéro-caséuse localisée.

Dans le cas 24, il s'agit d'une pyonéphrose tuberculeuse évoluant sur un rein polykystique. L'examen direct de l'urine était négatif le 11 avril et le 12 avril 1932. L'examen

direct et la culture du sédiment urinaire effectués à l'Institut Pasteur ont été négatifs le 18 avril 1932.

Dans le cas 60, il s'agit d'une malade chez laquelle on a soupçonné une tuberculose rénale pendant six mois. Les examens directs à la clinique du Pr. LEGUEU, le 16 mars 1932, le 8 août, le 20 août et le 24 août, ont tous été négatifs. L'échantillon que nous avons étudié le 24 août 1932 était négatif à l'examen direct, mais la culture s'est révélée positive (microcolonie dix-huit jours et culture macroscopique vingt-six jours après la date de l'ensemencement). L'examen direct est devenu positif pour la première fois le 30 septembre 1932, c'est-à-dire plus de cinq semaines après que nous ayons obtenu un résultat positif par culture. La pièce après néphrectomie le 5 octobre 1932, montrait une tuberculose très avancée.

Nous avons eu des résultats analogues avec d'autres lésions, comme l'hydronéphrose tuberculeuse cas 34, et la néphrite tuberculeuse.

Cette recherche nous a également montré que la bacillurie persiste, après une néphrectomie, pendant une période beaucoup plus longue qu'on ne le pensait jusqu'ici.

Chez la plupart des malades, les bacilles tuberculeux disparaissent pendant les six premiers mois après la néphrectomie, sauf dans les cas où il existe une infection bilatérale méconnue ou une infection de l'autre rein. Les cas 3, 24, 30 et 45 se rapportent à des malades examinés de deux à six ans après une néphrectomie.

La culture était encore positive alors que l'examen direct était négatif.

Dans le cas 3, 2 ans après l'opération.

Dans le cas 23, 4 ans après l'opération.

Dans le cas 30, 5 ans après l'opération.

Dans le cas 45, 6 ans après l'opération.

Ces résultats montrent qu'il convient d'employer plus

fréquemment la culture dans l'avenir pour l'étude des signes post-opératoires tels que fréquence, urine trouble, etc.

Dans notre recherche, sur 54 cas étudiés, nous n'avons jamais trouvé de bacilles aviaires, ni de bacilles paratuberculeux du smegma préputial.

En Amérique, COWEN et HENDERSON ont employé pour la culture de 20 échantillons d'urine de malades atteints de tuberculose rénale, le milieu de PETRAGNANI modifié par A. SAENZ avec 100. p. 100 de résultats positifs.

En France, en se servant de notre technique d'ensemencement et en pratiquant la recherche de la microculture, JOUY a pleinement confirmé nos constatations.

Il ressort de ces recherches expérimentales, cliniques et anatomo-pathologiques que, dans toutes les circonstances où l'on suppose que le bacille tuberculeux peut être présent dans une urine, on ne peut se contenter du seul examen direct, insuffisant au moins dans 25 p. 100 des cas, pour pouvoir établir un diagnostic étiologique. Il est indispensable d'ensemencer le culot de 20 à 50 cm³ d'urine sur 6 à 8 tubes de milieux préparés selon la technique indiquée, et surtout de procéder à l'examen systématique du produit de raclage de chaque tube à partir du huitième jour.

On peut ainsi, comme nous l'avons vu, poser un diagnostic précoce et précis dans bien des cas où l'examen direct du culot est négatif. Elle offre l'avantage de permettre l'isolement de bacilles acido-résistants (aviaires, paratuberculeux), non pathogènes pour cet animal, et aussi l'identification immédiate des types humains ou bovins qui se présentent. La simplicité, la facilité de l'emploi de la culture, ainsi que la rapidité et la précision des résultats qu'elle fournit l'imposent désormais pour le diagnostic des tuberculoses rénales.

ÉTUDE COMPARATIVE, PAR LA CULTURE ET PAR L'INOCULATION AU COBAYE, DES MUCOSITÉS PRÉLEVÉES PAR LAVAGES D'ESTOMAC POUR DÉCELER LE BACILLE DE KOCH CHEZ L'ENFANT TUBERCULEUX.

La possibilité de déceler le bacille de Koch dans l'estomac des nourrissons et des adolescents résulte des travaux de MEUNIER qui, en 1889, s'éleva contre l'opinion régnante de l'époque, d'après laquelle l'expectoration n'existant pas chez les enfants tuberculeux, la recherche des bacilles était donc impossible.

MEUNIER commença par remarquer le caractère fréquemment humide de la toux des enfants et constata le premier que ces petits malades déglutissent souvent leur expectoration. Cet auteur donna une démonstration définitive de ces observations en pratiquant le lavage stomacal à jeun et en mettant en évidence dans le contenu gastrique des flocons fibrineux ayant l'aspect des crachats et où il décèle par frottis la présence du bacille tuberculeux. Le bacille de Koch a pu ainsi être mis en évidence dans trois cas sur quatre de tuberculose de l'enfance, et ces résultats ont été contrôlés par l'autopsie.

Dans un second travail, MEUNIER examine un groupe de 13 enfants chez lesquels le diagnostic de tuberculose était douteux, et où il put à deux reprises trouver des bacilles. Peu de temps après, BERTHERAND, s'inspirant des résultats de MEUNIER, examine par ce procédé 30 enfants tuberculeux âgés de 1 à 4 ans ; chez 21 d'entre eux, il réussit à découvrir des bacilles acido-résistants, et l'évolution ultérieure de la

maladie montra bien que dans tous ces cas, il s'agissait de bacilles de Koch.

Toutefois, malgré ces essais encourageants, la méthode de MEUNIER tomba dans l'oubli, et elle n'occupa la place à laquelle elle avait droit que lorsqu'elle fut reprise par ARMAND DELILLE en 1927. En réalité, ce n'est qu'à partir de ce moment qu'elle est entrée dans la pratique courante, et c'est le grand mérite de cet auteur d'avoir insisté sur les services qu'elle pouvait rendre.

ARMAND DELILLE, en collaboration avec VIBERT, s'attache en premier lieu à perfectionner cette méthode : il s'adresse pour cela à la technique d'homogénéisation des crachats de BEZANÇON et PHILIBERT (homogénéisation à la soude), et il obtient par ce procédé, sur un total de 174 contenus gastriques, dans 6 cas des bacilles à l'examen direct sur 64 et 34 résultats positifs sur 110 cas, après homogénéisation. La signification de ces recherches peut se résumer ainsi :

1^o Tous les enfants atteints de forme ulcéro-caséreuse de tuberculose pulmonaire évolutive, présentent des bacilles décelables par l'examen direct dans le contenu stomacal.

2^o Parmi 34 sujets où il a décélé des bacilles après homogénéisation, 13 présentaient des signes cliniques et radiologiques de tuberculose, 18 des signes radiologiques, et les 3 derniers ne montraient aucun signe physique ou radiologique permettant de supposer une tuberculose ouverte.

3^o Parmi les cas négatifs, certains se rapportaient à des malades présentant des signes radiologiques évidents de tuberculose.

La valeur de cette méthode s'imposerait surtout dans le dépistage de la tuberculose de l'enfant, et pour apprécier les effets du pneumo-thorax artificiel. En 1932, sur 700 cas de lavage étudiés chez les nourrissons, ARMAND DELILLE trouve des bacilles tuberculeux chez 100 p. 100 des enfants présentant des lésions de tuberculose ulcéro-caséreuse et

chez 60 p. 100 des enfants montrant des ombres radiologiques suspectes.

OPITZ, qui a consacré depuis plusieurs années des études très intéressantes à cette question, a fait en 1933 une récapitulation de ses travaux se rapportant à la recherche du bacille de Koch par lavage d'estomac chez 206 enfants atteints de formes diverses de tuberculose, et chez 21 porteurs d'affections pulmonaires non spécifiques. Le nombre des résultats positifs s'élève au total à 107 et correspond aux formes anatomo-cliniques suivantes : dans la tuberculose pulmonaire progressive, (pneumonie caséuse, tuberculose miliaire, phtisie caverneuse) 100 p. 100 de résultats positifs, dans la méningite tuberculeuse le bacille de Koch a pu être décelé 8 fois sur 11, dans l'infiltration chronique du sommet considérée jadis comme une forme de tuberculose fermée, 4 résultats positifs sur 7 ; dans les cas d'infiltration péricale, 42 cas positifs sur 48, enfin chez 16 enfants atteints de dilatation bronchique, 3 résultats positifs.

Cet auteur signale encore un cas positif extrêmement intéressant concernant une fillette de 5 ans, dont les produits de lavage d'estomac ont tuberculisé le cobaye. Elle avait des poumons radiologiquement sains à l'exception d'un noyau calcaire de la grandeur d'un haricot et de quelques points calcifiés dans la région hilare.

Sept cas d'érythème noueux ont donné à OPITZ 6 résultats positifs, alors que 10 cas de pleurésie n'en ont fourni qu'un.

POULSEN en collaboration avec JENSEN et HUSTED étudient cette question d'une manière très approfondie, et arrivent en 1932 aux conclusions suivantes : les lavages d'estomac pratiqués sur un total de 629 enfants âgés de 0 à 10 ans, tous allergiques, donnent 199 résultats positifs. Un autre groupe de 293 enfants ayant moins de 3 ans fournit 142 résultats positifs.

D'après POULSEN, plus l'enfant est jeune, plus les

chances sont grandes de découvrir le bacille dans son estomac. Il fait observer au surplus qu'un seul examen ne suffit pas, car certains de ces malades n'ont donné une réponse positive qu'au 5^e lavage. Par des examens en série, POULSEN a pu retrouver le bacille de Koch pendant des mois (26 cas) et même des années (5 cas). Il considère comme exempt de bacille tout enfant qui, après deux lavages consécutifs faits à un ou deux mois d'intervalle, fournit des résultats négatifs. La valeur de cette méthode a été contrôlée par lui chez 158 enfants âgés de 1 à 4 ans qui ne réagissaient pas à la tuberculine ; parmi ceux-ci, 60 ont été soumis à deux lavages successifs, et aucun bacille n'a pu être décelé.

S'inspirant des travaux de POULSEN, d'autres auteurs danois ont pratiqué des recherches similaires. Ainsi FRIEDLAENDER a trouvé le bacille de Koch dans le mucus stomacal de 7 enfants sur 12 atteints de méningite tuberculeuse.

CLAUSEN signale 30 cas positifs sur 152 enfants de 0 à 15 ans. Dans ce groupe, 14 sujets, atteints d'affections non tuberculeuses, n'ont donné que des réponses négatives. En outre, le bacille de Koch a pu être mis en évidence chez 20 enfants sur 53 atteints de tuberculose pulmonaire ; parmi ceux-ci, 6 ne présentaient aucun signe physique ou radiologique suspect de tuberculose.

CHRISTOFFERSEN et FREDRIKSEN ont recherché le bacille par lavage d'estomac dans deux séries :

1^o Chez 36 enfants de différents âges non allergiques, et dont certains vivaient dans un milieu contaminé, les résultats ont toujours été négatifs.

2^o Chez 12 enfants allergiques de 1 à 7 ans, qui présentaient une infiltration discrète du parenchyme pulmonaire, 4 ont fourni des résultats positifs.

Particulièrement intéressantes sont les recherches de DORPH-PETERSEN qui a examiné, par ce procédé, 72 enfants de 2 à 14 ans atteints de localisations diverses de tuberculose chirurgicale. Sur 65 qui ont été radiographiés, 8 seule-

ment ont montré des signes d'imprégnation tuberculeuse pulmonaire discrète. De ces 72 enfants, un seul a donné un résultat positif ; il s'agissait d'une fillette de 13 ans présentant une adénopathie ulcéreuse de la région cervicale et des ombres hilaires avec des foyers de calcification à la radiographie.

En Suède, WALLGREN a appliqué depuis plusieurs années cette méthode pour mettre en évidence l'étiologie tuberculeuse de l'érythème noueux ; le bacille de Koch a pu être ainsi décelé chez 22 enfants sur 24 examinés.

Dans ce même ordre d'idée, PHILIPSON communique en 1932 ses résultats obtenus chez 110 enfants atteints d'érythème noueux, dont 4 ne réagissaient pas à l'intradermo-réaction à la tuberculine, même à la dose de 10 mgr. (1/10 de cm³ de la solution de tuberculine brute au 1/10). Les 96 autres enfants allergiques ont donné 47 résultats positifs. Chez les enfants qui présentent des lésions radiologiques initiales et circonscrites, la recherche du bacille de Koch dans des lavages successifs préconisés par POULSEN, augmente le pourcentage de résultats positifs.

LIGNER est parvenu chez un enfant de 7 mois, fébrile, en période anté-allergique, à déceler le bacille tuberculeux par lavage stomacal avant que vire la réaction tuberculique.

LUNDQUIST obtient 5 résultats positifs sur 13 malades examinés par cette méthode, NORDWALL, 12 réponses positives sur 34 enfants tuberculeux âgés de 1 à 10 ans.

KERESZTURI, HAUPTMANN, SCHICK et MISHULOW obtiennent 28 résultats positifs sur 100 enfants âgés de 8 mois à 16 ans. Dans l'analyse de leur travail, ces auteurs répartissent leurs cas en trois groupes : un premier groupe concernant des formes graves de tuberculose destructive donne 15 résultats positifs sur 20 ; le deuxième, qui correspond à des processus tuberculeux non destructifs, fournit 13 résultats positifs sur 43, enfin, un troisième groupe de 37 cas

comprenant 7 pleurésies tuberculeuses, 4 péritonites tuberculeuses et 26 infiltrations hilaires avec réaction de MANTOUX positive, n'a donné que des résultats négatifs.

BAUMANN sur 248 enfants allergiques de 0 à 15 ans a obtenu chez 165 d'entr'eux, montrant des signes plus ou moins avancés de tuberculose pulmonaire en voie d'évolution, 78 réponses positives, tandis que 83 présentant des formes de tuberculose initiale inactive (ombres hilaires) ont été négatives.

Les travaux de COLLIS et BROCKINGTON ont donné chez 52 enfants avec des formes diverses de tuberculose pulmonaire, 12 résultats positifs ; chez 18 enfants témoins non allergiques, tous les résultats ont été négatifs.

LANGER a recherché le bacille de Koch dans les liquides de lavage d'estomac de 99 enfants tuberculeux, et de 32 enfants apparemment sains qui lui ont servi de témoins et chez lesquels il n'a enregistré que des résultats négatifs. Parmi les tuberculeux, le bacille a pu être décelé chez 34 enfants.

SCHYLLA sur 55 enfants âgés de 1 à 13 ans, tous allergiques, obtient 13 résultats positifs, qui correspondaient à 4 tuberculoses actives, à 4 tuberculoses évolutives, à 3 infiltrations hilaires, et dans 2 cas à des lésions tuberculeuses exsudatives de complexus primaire.

En Pologne, ZEYLAND et PIASECKA ZEYLAND ont examiné 50 enfants dont 31 présentaient des bacilles tuberculeux. 24 de ces cas positifs correspondaient à des formes d'infiltration pulmonaire disséminée et 7 à des adénopathies hilaires. Ces auteurs ont réussi à déceler le bacille de Koch dans un cas d'adénopathie trachéo-bronchique deux semaines avant que la réaction à la tuberculine ne devînt positive.

MORQUIO et ses collaborateurs CANTONNET, BLANCH et JAUREGUI se sont adressés à cette méthode pour mettre en évidence le bacille de Koch chez les enfants atteints d'érythème noueux, et chez les nourrissons présentant des formes diverses de tuberculose. Leur pourcentage de cas

positifs coïncide avec ceux des auteurs précédents. ZAMBRANO, ACCORIMBONI, MARTIN et FAVER ont trouvé l'application de cette méthode extrêmement pratique.

EIZAGUIRRE et URALDE chez 21 enfants qui présentaient une tuberculose pulmonaire en évolution, sont parvenus à déceler dans 11 cas le bacille tuberculeux.

BANFI BRUZZONE a trouvé le bacille de Koch chez 92 p. 100 des enfants atteints de tuberculose pulmonaire et ganglionnaire cliniquement et radiologiquement établie.

Dans un important travail, LEVIN étudie 457 observations d'enfants âgés de 1 à 15 ans, dont 417 étaient allergiques. Les 40 autres qui servaient de témoins ont tous donné des résultats négatifs. Sur les 417 enfants tuberculeux, on a pratiqué 580 lavages parmi lesquels 249 ont été positifs et provenaient de 162 enfants. L'auteur a exclu de son travail 52 cas dont il ne possédait pas d'examen radiologique détaillé au moment des lavages. Il ne tient donc compte, pour établir son pourcentage, que de 355 enfants tuberculeux qui ont donné 159 résultats positifs. L'analyse de ces résultats en rapport avec les formes cliniques lui a permis d'établir les chiffres suivants : 100 p. 100 de résultats positifs chez les enfants atteints de tuberculose miliaire, de méningite tuberculeuse et de pneumonie caséuse, 76 p. 100 chez les enfants porteurs de lésions radiologiques parenchymateuses primaires et secondaires, 69 p. 100 dans les tuberculoses pulmonaires ou ganglionnaires en évolution, et enfin, 25 p. 100 dans les formes exclusivement ganglionnaires, sans périhilité.

SAYÉ, SHELTON et ALSINA, qui se sont beaucoup occupés de cette question, ont examiné dans un premier travail 107 enfants tuberculeux et 39 apparemment sains. Tous les enfants de ce dernier groupe ont donné des résultats négatifs. Chez 44 enfants tuberculeux, ils ont pu déceler le bacille de Koch ; dans ce groupe il est intéressant de mentionner que le bacille a pu être mis en évidence chez un

enfant dans la période anté-allergique, 15 jours avant que l'intradermo-réaction de MANTOUX ne devînt positive.

BOER, sur 73 cas dont 26 correspondaient à des tuberculoses évolutives et 47 à des formes initiales et fermées, obtient chez les premiers 23 résultats positifs et 2 seulement chez les seconds.

Notons encore les recherches de WIESE (9 résultats positifs sur 72 examens), de KEIRIES (16 sur 42) et de PENKERT (70 sur 87).

Tout dernièrement enfin, le Pr SAYÉ a recherché par l'inoculation au cobaye le bacille de Koch dans le contenu gastrique de 319 enfants de 0 à 10 ans, et de 239 adultes. Sur les 319 enfants, 94 non tuberculeux ont donné des résultats négatifs, alors que le lavage gastrique de 225 a tuberculisé le cobaye dans 86 cas (38,2 p. 100). Chez les adultes, 19 sujets sains ou douteux n'ont pas montré de bacilles dans leur contenu stomacal, tandis que chez 220 tuberculeux on a pu déceler le bacille de Koch à 61 reprises (27,7 p. 100).

Pour conclure, si nous réunissons les cas étudiés par tous les auteurs précités, nous totalisons 3.738 observations de sujets tuberculeux ou suspects de tuberculose, et nous obtenons un pourcentage global de résultats positifs d'environ 50 p. 100. Cette étude montre, de plus, que ce pourcentage est en relation avec l'âge des individus et avec la forme clinique de la maladie. Dans les formes sévères de tuberculose pulmonaire, ce chiffre atteint 90 à 100 p. 100, tandis que dans les processus plus bénins, il tombe à 30 et 40 p. 100. En général dans la première enfance, cette recherche donne 75 à 100 p. 100 de résultats positifs. Elle permet, en outre, d'affirmer l'origine pulmonaire des bacilles. Remarquons tout particulièrement que dans trois cas signalés par LIGNER, SAYÉ, ZEYLAND et PIASECKA ZEYLAND, le bacille de Koch a été mis en évidence en pleine période anté-allergique.

Les auteurs précédents sont arrivés à établir le diagnostic de tuberculose par l'étude des produits de lavage d'estomac

en s'adressant soit à l'examen direct, avant ou après homogénéisation (MEUNIER, ARMAND-DELILLE, LUNDQUIST, NORDWALL), soit à l'inoculation au cobaye (OPITZ, SCHMIDT et SAYÉ), soit enfin à la culture et à l'inoculation effectuées simultanément (POULSEN, FRIEDLAENDER, CLAUSEN et LEVIN, etc...)

Si on prend chez les auteurs les plus qualifiés, la moyenne des résultats donnés par ces trois méthodes de diagnostic, on arrive aux résultats suivants : POULSEN sur 270 résultats positifs, a décelé le bacille dans 11 p. 100 des cas par l'examen direct, dans 63 p. 100 par la culture, et dans 80 p. 100 par l'inoculation au cobaye. OPITZ et LEVIN arrivent à des constatations identiques.

Nous verrons plus loin que les recherches comparatives par la culture et l'inoculation au cobaye que A. SAENZ et nous-même avons entreprises pour la mise en évidence du bacille de Koch dans les liquides de lavage d'estomac, nous ont permis d'arriver à des conclusions différentes de celles des auteurs précédents.

TECHNIQUE DU PRÉLÈVEMENT DU CONTENU GASTRIQUE

Pour le prélèvement du contenu gastrique, nous avons employé la technique ci-jointe en usage à l'hôpital Hérold dans le Service de M. le Professeur Robert DEBRÉ.

Le lavage d'estomac est pratiqué chez l'enfant à jeun depuis 12 heures environ, et de préférence à son réveil ; on lui évitera alors toute sorte de mouvements actifs qui risqueraient de faire passer dans l'intestin les expectorations dégluties et accumulées dans l'estomac au cours de la nuit. Le prélèvement proprement dit consiste, l'enfant étant assis sur le bord du lit, à introduire par la bouche une sonde œsophagienne en caoutchouc munie d'un entonnoir d'une capacité de 500 cm³. Lorsque l'extrémité de la sonde a atteint

la cavité stomacale (ce qu'indique un trait indicateur marqué sur la sonde), on verse lentement dans l'entonnoir placé à 20 cm. environ au-dessus de l'orifice buccal de l'enfant, 100 à 200 cm³ d'eau tiède (35°) stérilisée. Par des mouvements de va-et-vient successifs on augmente l'efficacité du lavage. Après absorption complète du liquide, une cuvette stérilisée est placée sous le menton de l'enfant de façon à recueillir le mucus qui s'écoule généralement en grande abondance le long de la sonde. En retournant ensuite l'entonnoir dans la cuvette placée au pied du lit du patient, le contenu gastrique s'écoule totalement par siphonnage dans la cuvette. Il arrive fréquemment que l'enfant est pris de vomissement et rejette le liquide directement.

Le lavage d'estomac effectué dans ces conditions est une opération simple ; sur une trentaine de cas que nous avons pratiqués, nous n'avons jamais observé la moindre complication.

TECHNIQUE D'ENSEMENCEMENT (A. SAENZ et L. COSTIL)

Le liquide stomacal (100 à 200 cm³) est versé dans des godets métalliques stériles et centrifugé, pendant 20 minutes à une demi-heure, à une vitesse de 3.800 tours par minute. Après décantation du liquide surnageant, le culot de centrifugation est transvasé à l'aide d'une pipette graduée dans un mortier stérile et dissocié très soigneusement avec une petite quantité de sable également stérile (homogénéisation du produit). On traite ensuite le mélange ainsi préparé par son volume d'une solution d'acide sulfurique à 15 p. 100 pendant 20 minutes à une demi-heure suivant l'intensité de l'infection secondaire. On ajoute quelques gouttes de réactif indicateur (teinture de tournesol), et on neutralise avec une solution de soude à 30 p. 100 jusqu'à obtention d'un virage lilas, qui correspond à un p_H (6,8 à 7,2) voisin de la neutralité.

On mesure à la pipette graduée la quantité de produit ainsi préparé ; une première moitié est inoculée à parties égales à deux cobayes par voie sous-cutanée. L'autre moitié estensemencée sur 8 tubes de milieu à l'œuf-asparagine-vert malachite à raison de $1/2$ cm³ par tube. Les tubes bouchés au caoutchouc sont placés en position horizontale à l'étuve à 38°.

Nous avons étudié jusqu'à présent 42 liquides de lavage d'estomac. Nous ne ferons état dans cette recherche que de 31 cas provenant du service de M. le Professeur Robert DEBRÉ à l'Hôpital Hérold, pour lesquels l'étude comparative de la recherche du bacille de Koch par la culture et par l'inoculation est actuellement terminée.

En ce qui concerne l'inoculation au cobaye, nous ne considérons négatifs que les cas où les animaux éprouvés régulièrement à la tuberculine, ne réagissent pas pendant un délai d'au moins trois mois, et sont trouvés indemnes, à l'autopsie, de toute lésion tuberculeuse.

Sur les 31 échantillons examinés, 3 concernaient des enfants non allergiques, âgés de 1 à 3 ans, qui ne présentaient aucun signe de tuberculose et ont servi de témoins. Deux d'entre eux étaient atteints de congestion pulmonaire grippale, et le troisième de lymphogranulomatose maligne. Leur lavage d'estomac a donné un résultat négatif par l'examen direct, par la culture et par l'inoculation au cobaye.

Les 28 autres cas, tous allergiques, présentaient des signes plus ou moins suspects de tuberculose pulmonaire, et ont fourni 10 résultats positifs. Parmi ces derniers cas, 5 qui montraient des bacilles à l'examen direct, sont consignés dans le tableau N° 1.

Ce tableau indique que tous les échantillons positifs à l'examen direct ont donné par la suite une culture et ont tuberculisé le cobaye. Mais la culture a fourni une réponse dans un délai inférieur de moitié (20 jours en moyenne) à celui nécessaire pour tuberculiser le cobaye (40 à 50 jours).

N°	Enfant	Date	Examen direct	Macro-culture	Inoculation au cobaye	Diagnostic clinique
1	Lar ..	24-11-34	+	Jours 20	+ Entre 35 et 45 j.	Tuberculose pulmonaire. Pneumothorax.
2	Oud ..	14-1-35	+	21	» »	Tuberculose pulmonaire.
3	Nob ..	22-9-34	+	20	» »	Tuberculose ulcéro-casé- euse.
4	Gab ..	22-9-34	+	20	» »	Tuberculose pulmonaire. Pneumothorax.
5	Fer...	22-9-34	+	20	» »	Spléno-pneumonie.

Le diagnostic clinique posé montre que dans ces cas il s'agissait de formes de tuberculose pulmonaire assez sévères.

Les résultats concernant les 18 cas négatifs par l'examen direct, par la culture et par l'inoculation, sont réunis dans le tableau N° 2.

N°	Enfant	Examen direct	Examen direct	Macro culture	Inoculation		Diagnostic clinique
					Premier cobaye	Deuxième cobaye	
					jours 0 85	jours 0 19	
1	Sem ..	22-9-34	0	0			Tuberculose pulmonaire en régression.
2	Abr ..	24-9-34	0	0	0 65	0 117	Grippe.
3	Bay...	27-9-34	0	0	0 56	0 80	Pleurésie séro-fibrineuse.
4	Lef...	27-9-34	0	0	0 51	0 155	Spléno-pneumonie.
5	Mil ...	28-9-34	0	0	0 153	0 153	Bronchite.
6	Fau...	16-10-34	0	0	0 111	0 126	Néphrite hématurique.
7	God ..	16-10-34	0	0	0 139	0 139	Rhumatisme articulaire aigu.
8	Pet...	18-10-34	0	0	0 15	0 137	Pneumonie.
9	The ..	18-10-34	0	0	0 137	0 137	Troubles digestifs.
10	Gat ..	22-10-34	0	0	0 27	0 130	Congestion pulmonaire.
11	Les...	27-10-34	0	0	0 8	0 125	Contact tuberculeux.
12	Ste ...	27-10-34	0	0	0 10	0 19	Céphalée. Contact tuberculeux.
13	Maz ..	3-11-34	0	0	0 120	0 120	Contact tuberculeux.
14	Ran ..	3-11-34	0	0	0 4	0 23	Rougeole en convalescence.
15	Pia...	3-11-34	0	0	0 120	0 120	Hémiplégie.
16	Bau...	26-11-34	0	0	0 16	0 17	Pleurésie séro-fibrineuse.
17	Nov ..	26-11-34	0	0	0 33	0 94	Tuberculose pulmonaire.
18	Dub ..	26-11-34	0	0	0 34	0 94	Spléno-pneumonie.

Ce tableau montre que sur 18 cas examinés, 9 fois la clinique a pu établir qu'il ne s'agissait certainement pas de tuberculose (cas 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 14, 15). Dans les autres cas, les résultats sont en accord avec ceux des auteurs cités précédemment.

Restent à analyser 5 cas insérés dans le tableau N° 3, négatifs à l'examen direct, mais pour lesquels le bacille de Koch a pu être mis en évidence par la culture ou par l'inoculation.

N°	Enfant	Date	Examen direct	Macro-culture	Inoculation		Diagnostic clinique
					Premier cobaye	Deuxième cobaye	
				jours	jours	jours	
1	Pic ...	16-10-34	0	0	0 13	+ 136	Spléno-pneumonie. Chancre tuberculeux de l'aîne. Tuberculose généralisée.
2	Rog ..	22-10-34	0	+ 32	0 17	0 23	
3	Zen ..	21-11-34	0	+ 20	0 20	+ 50	Broncho-pneumonie tuberculeuse.
4	Dou ..	14-1-35	0	+ 27	+ 41	+ 41	Spléno-pneumonie.
5	Laz ..	44-1-35	0	+ 22	0 2	0 30	Tuberculose pulmonaire.

L'étude de ce tableau montre que pour 2 de ces cas (N° 3 et 4) la culture et l'inoculation au cobaye ont donné des résultats positifs concordants, mais la culture a fourni un diagnostic beaucoup plus rapide (20 à 27 jours) que l'inoculation au cobaye (41 à 50 jours). Il est encore plus important d'analyser les 3 autres cas (1, 2 et 5). Le cas N° 7 ne donne lieu à aucun développement de culture, mais l'inoculation simultanée du produit à deux cobayes tuberculise un des animaux après 136 jours. Par contre, les cas 2 et 5 qui ont donné une culture de bacilles tuberculeux entre 22 et 32 jours n'ont pas tuberculisé les cobayes, morts de maladie intercurrente entre les 20^e et 30^e jours consécutifs à l'inoculation.

En résumé, 19 enfants présentant des signes de tuberculose, ont donné 50 p. 100 de résultats positifs.

Nos constatations sont en parfait accord avec les faits observés par OPITZ, POULSEN et LEVIN. Entre autres, LEVIN indique dans sa statistique 12 cas où le cobaye n'a pas été tuberculisé, mais où la culture a donné une réponse positive. Cependant le fait contraire, cobaye positif et culture négative, a été aussi fréquemment observé.

Il ressort des constatations précédentes, que les lavages d'estomac qui présentent des bacilles à l'examen direct, chez des enfants atteints de forme avancée de tuberculose pulmonaire, donnent 100 p. 100 de résultats positifs par la culture et par l'inoculation au cobaye.

En ce qui concerne les échantillons qui ne montrent pas de bacilles à l'examen direct, la culture et l'inoculation peuvent donner des résultats discordants ; dans certains cas, le cobaye s'avère plus sensible que la culture, et dans d'autres on observe le fait inverse.

L'ensemble de ces constatations nous amène aux conclusions suivantes :

1^o Chaque fois qu'il s'agit de mettre en évidence le bacille de Koch dans les liquides de lavage d'estomac présentant des bacilles acido-résistants à l'examen direct, l'ensemencement suffit au point de vue pratique et remplace l'inoculation au cobaye. La simplicité de la culture, sa précision égale à l'inoculation au cobaye, l'économie de frais et de temps qu'elle offre, la rendent préférable à toutes les autres méthodes de diagnostic bactériologique. En outre, l'emploi des milieux à l'œuf-asparagine-vert malachite, que nous avons préconisés, permet d'arriver à la différenciation immédiate des types de bacilles tuberculeux humains ou bovins.

2^o Il est indispensable cependant, dans les liquides négatifs à l'examen direct, de pratiquer simultanément la culture et l'inoculation au cobaye, car ces deux méthodes se complètent. En employant isolément un seul de ces procédés,

on court le risque de poser un diagnostic inexact dans un cas positif. Il est nécessaire, dans ce cas, de prolonger l'observation des cobayes ainsi inoculés pendant un délai d'au moins 3 mois.

Le problème que pose le diagnostic bactériologique de la tuberculose par l'examen du contenu gastrique est identique à celui de la recherche du bacille de Koch dans les crachats. Il s'agit, en réalité, des mêmes produits, comme l'ont déjà démontré OPITZ, POULSEN, et tout dernièrement SAYÉ, qui ont obtenu dans une étude comparative le même pourcentage de résultats positifs avec les crachats et les liquides de lavage d'estomac appartenant aux mêmes malades. D'ailleurs, il est intéressant de constater que dans ces recherches, nous arrivons à des conclusions identiques à celles que nous a fournies l'étude bactériologique de la tuberculose pulmonaire par l'examen des crachats.

Cette méthode offre encore l'avantage d'être aussi sensible chez l'enfant que chez l'adulte. De plus, son application permet de suivre les effets et d'affirmer la guérison du pneumo-thorax thérapeutique chez l'enfant et chez l'adulte, comme l'ont démontré les travaux d'ARMAND DELILLE, OPITZ, POULSEN, JONESCO et SAYÉ. Tout dernièrement, SAYÉ a utilisé cette méthode pour dépister la tuberculose chez les étudiants.

En outre, ce procédé remplace dans une grande mesure la mise en évidence du bacille de Koch dans les matières fécales. En effet, le bacille tuberculeux est présent dans les matières fécales surtout dans les cas de tuberculose intestinale ou dans les formes très avancées de tuberculose pulmonaire ; comme l'ont démontré les travaux de CRUCHET et LEPAGE, MIKULOWSKI, ZAPPA et SZULCE, il s'y trouve très rarement dans les formes bénignes de tuberculose et dans les cas non évolutifs. Nous ne possédons pas à l'heure actuelle un procédé sûr qui nous permette d'isoler le bacille de Koch des fèces. De plus, cette recherche présente l'incon-

vénient d'être très souvent viciée par la présence de bacilles paratuberculeux, qui existent en très grand nombre dans les matières fécales (CRAMER et JIACOMI).

BAUMANN, qui a fait une étude comparative du contenu gastrique et des fèces de ses malades par l'inoculation au cobaye, arrive aux résultats suivants :

Lavages et fèces tous deux négatifs ...	Dans 222 examens
» » positifs.....	» 9 »
Lavages positifs et fèces négatives	» 26 »
» négatifs et fèces positives	» 12 »

Ce travail indique très nettement la supériorité de la recherche du bacille de Koch dans les lavages d'estomac qui a permis d'obtenir un nombre de résultats positifs deux fois plus grand que dans les matières fécales.

La recherche du bacille tuberculeux dans les fèces n'offre donc aucune garantie par l'examen direct, par la culture ou par l'inoculation au cobaye. Dans des essais inédits entrepris à l'aide de ces deux dernières méthodes par A. SAENZ en collaboration avec A. FIEHRER et nous-même, nous avons rarement réussi à avoir des résultats positifs. Nous avons été constamment gênés par la présence du bacille du côlon, du *bacillus subtilis* et de microbes sporulés anaérobies de l'intestin, qui ont résisté à l'action de l'acide sulfurique à 20 et 25 p. 100 pendant 20 à 30 minutes. L'emploi de telles concentrations d'acide risque, bien entendu, de détruire en grande partie les bacilles tuberculeux qui pourraient exister dans le produit examiné.

Pour ces raisons, nous ne ferons pas état dans ce travail des recherches que nous avons entreprises sur la culture et l'inoculation au cobaye pour la mise en évidence du bacille de Koch dans les matières fécales.

RECHERCHE DU BACILLE DE KOCH DANS LES BIOPSIES D'ORIGINE HUMAINE ET DANS DES FRAGMENTS D'ORGANES PRÉLEVÉS CHEZ DES ANIMAUX INOCULÉS EXPÉRIMENTALEMENT.

La recherche du bacille de Koch en partant de tissus prélevés dans la clinique humaine, est rarement mise en œuvre. Cependant, dans un nombre de cas limités, cette recherche est indispensable, et l'emploi des techniques actuelles d'ensemencement et d'inoculation donne des résultats encourageants. Dans ce chapitre nous avons réuni les résultats obtenus avec les biopsies d'origine humaine et les fragments d'organe prélevés chez les animaux inoculés expérimentalement, étant donné la similitude des techniques de prélèvement et d'isolement que nous avons employées dans ces cas.

Technique de prélèvement. — Il est indispensable de s'entourer de toutes les garanties nécessaires, pour que les résultats obtenus en partant de biopsies soient à l'abri de toute critique. Les prélèvements chez les malades seront toujours faits avec des instruments stériles, après désinfection préalable de la peau à la teinture d'iode, suivie de lavage à l'alcool et à l'eau physiologique stérile. Il est préférable aussi d'éviter l'emploi des anesthésiques qui pourraient nuire à la vitalité du bacille de Koch. Les fragments de tissus après leur extirpation seront immergés dans des flacons contenant quelques cm³ d'eau distillée ou d'eau physiologique stérile. Ces flacons hermétiquement fermés, seront transportés le plus tôt possible au laboratoire.

Dans la recherche du bacille de Koch dans les fragments d'organes provenant de cadavres, nous avons observé les mêmes précautions.

Quand il s'agit de prélèvements effectués sur les animaux de laboratoire après leur mort, il faut avoir soin de mouiller préalablement leurs poils au moyen d'une solution antiseptique, pour éviter les contaminations secondaires par les germes entraînés avec les poils au moment de l'ouverture de l'animal. Au moyen d'instruments stériles, nous détachons la peau des plans musculaires profonds, et avant l'ouverture de l'animal on cautérise la région à sectionner. On prélève ensuite, avec de nouveaux instruments stériles, l'organe ou le fragment d'organe à examiner. Bien entendu, quand les prélèvements portent sur plusieurs organes, nous nous servons chaque fois d'instruments différents.

Technique d'ensemencement (A. SAENZ et L. COSTIL). — Les fragments d'organe, recueillis comme il a été indiqué précédemment, sont coupés en fins morceaux et placés dans un mortier stérile. On prélève à ce moment pour l'examen microscopique un petit fragment de la grandeur d'un grain de millet, qu'on écrase entre deux lames neuves et qu'on étale par un mouvement de va-et-vient. Aux organes finement broyés à sec avec une petite quantité de sable stérilisé à 180°, on ajoute de l'eau distillée stérile en quantité variable suivant la consistance du produit. On mesure au moyen d'une pipette graduée le volume de la suspension de l'organe à traiter ; on réserve, s'il y a lieu, la moitié du produit pour l'étude comparative par l'inoculation au cobaye. Nos recherches ont montré que les biopsies de la clinique humaine sont en général peu contaminées ; par conséquent les cobayes résistent à l'inoculation directe de ce broyage. On traite la partie réservée à l'ensemencement par un volume égal d'acide sulfurique à 15 p. 100 pendant 15 à 30 minutes, suivant l'intensité de la flore secondaire. On introduit alors quelques gouttes de tournesol (réactif

indicateur), et on neutralise avec une solution de soude à 30 p. 100 jusqu'au virage lilas correspondant à un pH entre 6,8 et 7,2. On peut aussi, si on désire avoir un examen direct du produit ainsi homogénéisé, prélever une petite quantité pour faire un frottis qui sera examiné après coloration par la méthode de ZIEHL-NEESEN. On ensemence la totalité à raison de 0,5 cm³ par tube, à la surface de 6 à 8 tubes de milieu à l'œuf-asparagine-vert malachite qui sont ensuite placés en position horizontale à l'étuve à 38°.

Nous avons eu l'occasion de pratiquer des centaines de prélèvements d'organes d'animaux infectés expérimentalement et pour lesquels les résultats ont été précis et très réguliers. Le tableau ci-dessous contient une partie de ces résultats.

Origine des souches	Animal	Produits	Méthode de neutralisation à la soude
Hum. Ba.	Cobaye	rate	9 colonies
—	—	ganglion	nombreuses
Av. Bis. S	Poule	foie	—
—	Lapin	foie	3 colonies
—	Cobaye	foie	quelques
—	—	rate	très nombreuses
—	—	poumon	assez nombreuses
Hum. Bo.	Lapin	cerveau	nombreuses
Hum. Ch.	Cobaye	poumon	—
—	Cobaye	rate	très nombreuses
Hum. Ga. S	Cobaye	pus	nombreuses
—	Lapin	foie	très nombreuses
—	—	rate	—
—	—	poumon	—
—	Lapin	foie	—
—	—	rate	—
—	Lapin	foie	nombreuses
—	—	rate	—
—	—	pus	—
—	Cobaye	pus	quelques
—	Cobaye	pus	rares
—	—	rate	nombreuses
—	Poule	rate	—
—	—	foie	quelques
—	—	rein	nombreuses
L. C. R. 8	Lapin	poumon	—
L. C. R. 26	Cobaye	ganglion	très nombreuses
Av. O. S.	Lapin	foie	—
—	—	rate	—
—	Lapin	rate	—
Av. O. R.	Poule	rate	nombreuses
—	—	foie	quelques
Av. O.	Cobaye	pus	nombreuses
—	Poule	rate	—
Hum. Ratti S.	Cobaye	pus	assez nombreuses
Hum. R.	Cobaye	pus	nombreuses
Bov. V.	Cobaye	ganglion	rares
Hum. T.	Cobaye	ganglion	nombreuses
Hum P.	Cobaye	rate	—
Hum T. S.	Cobaye	rate	4 colonies
Bov. V. S.	Poule	foie	très nombreuses
—	Poule	foie	nombreuses
—	Poule	foie	très nombreuses
—	Poule	rate	—
—	Lapin	poumon	une colonie
Hum. Ch.	Cobaye	rate	plusieurs colonies

Dans un deuxième tableau, nous avons réuni les résultats des biopsies provenant exclusivement de la clinique humaine.

N ^o	Malade	Biopsies	Date	Examen direct	Culture	Inoculation au cobaye	
						1	2
					jours	jours	jours
1	Maz ..	Nodosité du genou	10-12-31	0	0	0	0
2	Rab ..	» » »	29-12-31	0		+ 53	+ 79
3	Vin ..	» » coude	30-12-31	0	0	0	0
4	Cas...	» » »	14-1-32	0	0	0	0
5	Fre...	Elément de psoriasis	8-2-32	0	0	0	0
6	Gef...	Nodosité du coude	13-2-32	0	0	0	0
7	Fra ..	Elément de psoriasis	20-2-32	0	0	0	0
8	Aff ...	» » »	5-3-32	0	0	0	0
9	Dev ..	Nodosité du coude	22-3-32	0	0	0	0
10	Dub ..	Elément de psoriasis	5-3-32	0	0	0	0
11	Mes ..	Nodosité du genoux	6-6-32	0	0	0	0
12	Chi...	Elément de psoriasis	29-10-32	0	0	0	0
13	Coc ..	» » »	29-10-32	0	0	0	0
14	Dum ..	» » »	12-11-32	0	0	0	0
15	Nev ..	» » »	19-11-32	0	0	0	0
16	Ler...	» » »	19-11-32	0	0	0	0
17	Deg...	» » »	19-11-32	0	0	0	0
18	Pop...	» » »	26-11-32		0	0	0
19	Gau ..	Nodosité du coude	12-12-32	+	0	0	0
20	Sib ...	» » doigt	6-3-33	+	+ 14	0	0
21	Coc ..	» » coude	6-4-33	0	0	0	0
22	Bou...	» » genou	10-9-33	0	0	0	0
23	Par ..	» » »	29-9-33	0	0	0	0
24	Chr ..	Nodosité rétro-olécran	6-5-33	0	0	0	0
25	X	Synoviale	4-12-33	0	0	0	0
26	Lam ..	Ganglion épitrochléen	15-12-33	0	0	0	0
27	Sim ..	Nodosité du coude	5-3-34	0	+ 20	+ 28	0 12
28	Sim ..	Ulcération linguale	5-3-34	0	+ 20	0 2	0 26

Les cas positifs n^{os} 27 et 28 concernent deux biopsies pratiquées chez un même malade au niveau du coude et de la langue. La culture a fourni un diagnostic plus rapide que l'inoculation. Dans le cas 28, par suite de la mort prématurée des animaux, due à des maladies intercurrentes, le diagnostic n'a pu être posé que par la culture. Les caractères cultureux des bacilles isolés ont permis, en outre, de les

identifier comme bacilles du type bovin, ce qui a été confirmé par l'inoculation au lapin.

Quant au n° 20, il a donné un bacille acido-alcool-résistant qui se développait rapidement entre 15 et 45°. Ses caractères culturels et l'absence de propriétés pathogènes, nous ont permis de le ranger dans le groupe des bacilles paratuberculeux saprophytes. Il nous reste à interpréter le résultat donné par le cas n° 15. Il s'agissait de la biopsie d'une nodosité du coude dont l'examen direct a révélé la présence de bacilles acido-résistants de morphologie normale. Mais l'ensemencement de ce produit ainsi que l'inoculation au cobaye ont donné un résultat négatif. Il est très vraisemblable qu'il ne s'agissait pas de bacilles morts amenés par les manipulations, car ils ont été trouvés au niveau d'un petit abcès mis à jour en coupant cette nodosité au moment de son ensemencement. Nous nous trouvons donc vraisemblablement en présence de bacilles acido-résistants saprophytes qui, comme nous l'avons déjà démontré, ne résistent pas, pour la plupart, à l'action prolongée de l'acide sulfurique, ce qui expliquerait l'insuccès de la culture.

RECHERCHES SUR LA BACILLEMIE TUBERCULEUSE

DANS LA TUBERCULOSE EXPÉRIMENTALE
LA BACILLÉMIE
EST TRÈS PRÉCOCE ET FACILEMENT DÉCELABLE

*Difficulté de la mise en évidence du bacille de Koch
dans le sang circulant des tuberculeux*

Recherche de la bacillémie tuberculeuse par la méthode
de LOEWENSTEIN — Ses bases expérimentales — Ses ré-
sultats — Contrôle de cette méthode par les experts nommés
par le Comité d'Hygiène de la Société des Nations — Con-
clusions.

*Caractères et signification de la bacillémie
dans la clinique humaine*

LA BACILLÉMIE TUBERCULEUSE

Recherches expérimentales et cliniques.

Depuis la découverte du bacille de Koch, la recherche de la bacillémie au cours de l'infection tuberculeuse n'a pas cessé d'intéresser les cliniciens et les bactériologistes. Fait bien explicable, car la conception même de la tuberculose, considérée comme maladie locale par les uns, septicémique par les autres, — ces deux points de vue opposés trouvent encore des partisans convaincus — est fondée sur l'appréciation exacte du rôle que joue la bacillémie dans cette affection.

D'ailleurs, l'étude de ce sujet a subi des fluctuations diverses, car la recherche de la bacillémie dans la clinique humaine a soulevé des discussions chaque fois qu'une technique nouvelle est apparue comme susceptible de mettre en évidence le bacille de Koch dans le sang circulant des malades. Mais, comme nous le verrons au cours de ce chapitre, les résultats obtenus, discordants et contradictoires suivant les différents chercheurs, n'ont jamais été concluants.

Il nous a semblé logique de commencer cette étude par la recherche de la bacillémie expérimentale dont la solution, en raison des facteurs qui entrent en jeu, est moins complexe que dans la clinique humaine.

RECHERCHE DE LA BACILLÉMIE DANS LA TUBERCULOSE EXPÉRIMENTALE

A l'heure actuelle, on peut dire que, dans l'ordre expérimental, l'existence de cette bacillémie chez les animaux artificiellement infectés est un fait acquis. Les travaux de ces dernières années ont réussi à démontrer, par des méthodes simples, que le passage des bacilles dans le sang des animaux tuberculeux est si fréquent et si constant qu'il est maintenant universellement admis par les expérimentateurs.

Parmi tant d'autres, les recherches déjà anciennes de BISANTI et PANISSET (1905) avaient nettement démontré chez le chien, soumis pendant 24 heures à la diète hydrique, qu'un repas infectant, contenant des bacilles tuberculeux, était suivi 4 ou 5 heures après de l'apparition d'une bacillémie. Ces auteurs avaient également réussi à tuberculiser le cobaye par l'inoculation de lymphes dans le canal thoracique.

En 1913, MASSOL et BRETON, de l'École de CALMETTE, étudiaient chez le cobaye l'apparition de la bacillémie consécutive à une injection virulente d'un mgr. par la voie sous-cutanée. La bacillémie est déjà nette après 24 heures, décelable jusqu'au 10^e jour ; ultérieurement, elle tend à disparaître. Lorsque l'injection est faite directement dans le torrent circulatoire, la présence du bacille dépend de la dose inoculée ; constant avec les doses massives initiales, son comportement est différent avec des doses plus faibles.

Ces résultats ont été confirmés plus tard par GRIFFITH, ROBERT DEBRE et BARON, ALLEN KRAUSE, WILLIS et en dernier lieu, par A. BOQUET, J. VALTIS et A. SAENZ, qui démontrent, non seulement la constance de la bacillémie

dans la tuberculose expérimentale, mais aussi les relations étroites qui existent entre la rapidité de son apparition, la quantité de germes infectants, leur virulence et les voies d'introduction ou d'inoculation employées.

En étudiant le mécanisme de l'infection par le bacille tuberculeux des mammifères inoculé au cobaye par voie péritonéale, A. BOQUET et A. SAENZ avaient démontré la rapidité et la constance avec lesquelles ces bacilles passent et se retrouvent dans la circulation sanguine. Des cobayes ayant reçu par voie péritonéale 0 mgr. 001 de bacilles virulents, souche bovine Vallée, en suspension dans 1 cm³ d'eau physiologique, accusent une bacillémie décelable par l'inoculation au cobaye, qui se manifeste déjà 2 à 4 heures après l'inoculation pour diminuer, sans disparaître, pendant la période d'invasion, et se reproduire dans la période terminale de la maladie.

Les auteurs précédents, et en particulier, A. BOQUET, avaient réussi à déceler la bacillémie par inoculation du sang infecté au cobaye. Avec A. SAENZ, nous nous sommes proposé, en appliquant la technique d'hémoculture de LOEWENSTEIN que nous décrirons plus loin, de mettre en évidence le bacille de Koch dans le sang circulant des animaux artificiellement infectés. Nous sommes parvenu assez facilement à suivre la marche de la bacillémie dans la tuberculose expérimentale, à condition d'injecter des doses massives et d'employer des voies d'inoculation sévères, telles que les voies intra-péritonéale et intra-ganglionnaire de NINNI. Les résultats, consignés dans le tableau ci-dessous et obtenus par la culture, sont superposables à ceux que donne l'inoculation du sang au cobaye.

*Cobaye inoculé par voie péritonéale
avec la souche humaine Ratti
(1 milligramme) et saigné par ponction du cœur*

Intervalle entre l'inoculation et les prélèvements	Nombre de colonies par cent. cube de sang
1 jour	9
3 »	2
6 »	0
8 »	0
10 »	2
21 »	6

Ce cobaye est mort, deux jours après la dernière saignée, de tuberculose généralisée.

*Cobaye inoculé par voie péritonéale
avec la souche bovine Vallée
(1 milligramme) et saigné par ponction du cœur*

Intervalle entre l'inoculation et les prélèvements	Nombre de colonies par cent. cube de sang
1 jour	9
3 »	2
5 »	0
7 »	0
15 »	0
21 »	3

Ce cobaye, mort vingt-sept jours après l'inoculation, présentait des lésions de tuberculose généralisée.

Chez les cobayes inoculés par voie intraganglionnaire avec des bacilles de type humain, la bacillémie est décelable par hémoculture avec les mêmes caractères, comme le montre le tableau ci-dessous :

*Cobaye ayant reçu 2 milligrammes d'une souche humaine
dans le ganglion cervical droit*

Intervalle entre l'inoculation et les prélèvements	Nombre de colonies par cent. cube de sang
2 jours	3
3 »	1
5 »	1
7 »	1
9 »	1
21 » (période agonique)	8

L'autopsie de ce cobaye, mort aussitôt après la saignée, permet de constater l'hypertrophie et la caséification du ganglion cervical droit, des lésions de broncho-pneumonie tuberculeuse, des nodules parsemant le foie et la rate, et la caséification des ganglions inguinaux et sous-hépatiques.

Avec la dose de 1 mgr. inoculé par la même voie, l'hémoculture pratiquée comme précédemment a donné des résultats superposables.

*Cobaye ayant reçu 1 milligramme d'une souche humaine
dans le ganglion cervical droit.*

Intervalle entre l'inoculation et les prélèvements	Nombre de colonies par cent. cube de sang
1 jour	13
3 »	12
6 »	4
10 »	0
20 »	0
34 »	0
50 »	1
60 »	1

Ce cobaye est mort de tuberculose généralisée soixante-cinq jours après l'inoculation.

Chez le lapin, nous avons recherché la bacillémie en utilisant la voie intraveineuse. Nous avons inoculé à deux de

ces animaux 1 mgr. de bacilles tuberculeux du type aviaire cultivés depuis vingt jours sur pomme de terre glycéinée et émulsionnés en eau physiologique. Les prélèvements ont été effectués à des intervalles variables d'après la technique suivante. A l'aide d'une seringue contenant $1/2$ cm³ d'eau distillée stérile, on prélève aseptiquement $1/2$ cm³ de sang par ponction de la veine marginale de l'oreille. On agite fortement et on ensemence le sang hémolysé à la surface de 4 tubes de milieu à l'œuf-asparagine-vert malachite, à raison de $1/4$ de cm³ par tube. Voici les résultats obtenus :

Lapin A

Intervalle entre l'inoculation et les prélèvements	Nombre de colonies par cent. cube de sang
30 minutes	656
1 heure	1.026
2 heures	837
4 »	167
24 »	30
5 jours	6
15 »	560

Ce lapin, mort le lendemain de la dernière saignée, a été trouvé porteur de lésions de tuberculose généralisée aiguë, type Yersin, caractérisée par l'hypertrophie de la rate et du foie et des lésions granuleuses sur les poumons. Les frottis de tous ces organes contenaient de nombreux bacilles acido-résistants.

Le lapin B, mort dans le même délai, a donné des résultats superposables à ceux du lapin précédent.

En inoculant dans les mêmes conditions $1/100^e$ ou $1/1.000^e$ de milligramme de bacilles tuberculeux, type aviaire, au lapin, les résultats sont moins nets, comme le montre l'exemple suivant :

Lapin inoculé avec 1/1.000^e de milligramme d'une souche aviaire par voie intraveineuse

Intervalle entre l'inoculation et les prélèvements	Nombre de colonies par cent. cube de sang
6 heures	20
24 »	3
3 jours	1
6 »	3
10 »	0
15 »	0
21 »	0
27 »	0
35 »	2

Ce lapin est mort de maladie intercurrente trois jours après la dernière saignée.

Comme suite à ces recherches, nous avons étudié le mécanisme de la bacillémie produite par le bacille aviaire chez la souris. En raison de la forme septicémique habituelle que l'infection aviaire provoque chez cet animal, et de la facilité avec laquelle ce germe se développe sur les milieux de culture appropriés, nous avons simplement procédé par ensemencement direct du sang.

Voici la technique que A. SAENZ a adoptée avec nous-même. Dans une première série d'expériences, 10 souris, sensiblement de même poids, ont reçu par voie péritonéale sous le volume de 0 cm³ 5, 0 mgr. 1 d'une souche de bacilles aviaires récemment isolée, cultivée sur pomme de terre glycerinée et âgée de quinze jours. Leur sang a été ensuite prélevé à des intervalles variés de la manière suivante. Après avoir désinfecté la queue à l'alcool, on la sectionne avec des ciseaux stériles à 1 ou 2 millimètres de son extrémité. On plonge alors dans la goutte de sang qui sourd l'extrémité d'une fine pipette contenant déjà V ou VI gouttes d'eau distillée stérile ; on aspire légèrement pour bien diluer le sang, et on ensemence le tout sur un tube de milieu de LOEWENSTEIN. On répète l'opération pour ensemencer de la même manière un deuxième tube.

Intervalle entre l'inoculation et les prélèvements	Nombre de colonies par cent. cube de sang
30 minutes	37
2 heures	15
4 »	19
7 »	2
24 »	1
2 jours	8
5 »	1
12 »	15
22 »	20

Une deuxième série d'expériences a porté sur 10 autres souris qui ont reçu, suivant la même technique, 1/100^e de milligramme de la même souche.

Intervalle entre les inoculations et les prélèvements	Nombre de colonies par cent. cube de sang
30 minutes	5
2 heures	2
4 »	2
7 »	1
24 »	1
2 jours	1
5 »	0
12 »	0
22 »	0

Un troisième lot de 10 souris a été inoculé avec 1/1.000^e de milligramme dans les mêmes conditions que précédemment.

Intervalle entre l'inoculation et les prélèvements	Nombre de colonies par cent. cube de sang
30 minutes	2
2 h. 1/2	1
6 heures	0
24 »	0

Les souris du premier lot, inoculées avec 0 mgr. 1, sont mortes dans un délai variant de 20 à 25 jours. La rate et le foie hypertrophiés fourmillaient de bacilles et présentaient

le type classique de tuberculose décrit par YERSIN en 1888 chez le lapin. Par contre, les souris qui avaient reçu 1/100^e et 1/1.000^e de milligramme ont vécu beaucoup plus longtemps et présentaient des lésions chroniques de tuberculose généralisée.

Une autre expérience, effectuée dans les mêmes conditions avec une souche aviaire IV, entretenue depuis longtemps au laboratoire, a fourni des résultats identiques.

Nos constatations établissent d'abord que le bacille aviaire passe très rapidement dans la circulation sanguine, et ensuite qu'avec la dose de 0 mgr. 1, on provoque une bacillémie permanente. Cette bacillémie, très abondante dès les premières heures après l'inoculation, diminue les jours suivants, puis augmente dans la phase terminale. Par contre, avec les doses de 1/100^e et 1/1.000^e de milligramme, la bacillémie, également précoce dans ses débuts, s'arrête quelques heures après.

Cet ensemble de résultats a été confirmé par SHAPIRO, qui observe une bacillémie constante chez les lapins inoculés avec des doses massives (de 1 à 10 milligr.) de bacilles humains ou aviaires. Abondante au début, cette bacillémie diminue pendant un certain temps, puis augmente à la période terminale de la maladie.

TIEDEMANN a pratiqué des hémocultures sur milieu de LOEWENSTEIN chez des lapins inoculés avec 10 milligrammes par voie sous-cutanée ; la culture ne s'est montrée positive qu'à la 24^e heure et au 17^e jour consécutifs à l'inoculation. Chez les lapins injectés avec 1/100^e de milligramme par voie intraveineuse de bacilles bovins ou humains, les hémocultures ont été positives pendant les deux premiers jours.

NINNI et DE SANCTIS MONALDI ont pratiqué leurs cultures à partir de cobayes inoculés avec 1/100^e et 1 milligramme de bacille humain dans la cavité péritonéale ; ils ont pu mettre en évidence la bacillémie à partir de la 24^e heure jusqu'au 10^e jour.

Enfin, TOMESCO a trouvé par la méthode de LOEWENSTEIN chez le chien infecté par voie intraveineuse ou par voie digestive, des bacilles dans le sang aux différents stades de l'infection tuberculeuse. Cet animal, inoculé avec de fortes doses dans la veine, présente une bacillémie permanente, massive initialement, avec un affaiblissement d'intensité entre le 20^e et le 30^e jour. Chez trois chiens infectés « *per os* », l'apparition de la bacillémie a pu être mise en évidence dans deux cas entre la 34^e et la 48^e heure.

L'ensemble de nos recherches et des constatations précédentes concernant le cobaye, le lapin et la souris peut être résumé ainsi :

1^o L'intensité et l'ampleur de la bacillémie expérimentale pour les animaux réceptifs, qu'il s'agisse du bacille des mammifères ou du bacille aviaire, dépendent de la dose et de la voie d'inoculation ; le mécanisme pathogénique est identique dans ces divers cas.

2^o Chez les animaux inoculés par voie intrapéritonéale ou par voie intraganglionnaire avec des doses massives, la bacillémie est déjà décelable par culture quelques minutes après l'inoculation ; elle dure de quelques heures à plusieurs jours, diminue ou même disparaît dans la suite, et réapparaît dans la période terminale chez les animaux qui meurent de tuberculose évolutive.

Nous trouverons plus tard l'application de ces données expérimentales, lorsque nous aurons l'occasion d'étudier la signification des résultats positifs obtenus par hémoculture chez les tuberculeux.

RECHERCHE DU BACILLE DE KOCH DANS LE SANG CIRCULANT EN CLINIQUE HUMAINE. LA MÉTHODE DE LOEWENSTEIN

Si les faits concernant la bacillémie expérimentale restent définitivement acquis, un aperçu de l'importante littérature consacrée à la mise en évidence du bacille de Koch dans le sang circulant de malades tuberculeux permet de nous rendre compte des fluctuations que cette recherche a subies au cours des différentes époques.

En Allemagne, de 1909 à 1914, un grand nombre d'auteurs considéraient la bacillémie comme très fréquente, non seulement au cours de la tuberculose pulmonaire évolutive, mais encore dans certaines formes frustes ou latentes.

Ainsi, ROSENBERG trouve fréquemment par l'examen direct, dans le sang circulant de 125 tuberculeux à divers stades, des bacilles acido-résistants en grand nombre. PETTY et MENDENHALL, en employant la même technique, réussissent 9 fois sur 10 à déceler des bacilles acido-résistants; il faut remarquer dans ce dernier groupe deux typhiques, un tabétique et un sujet en bonne santé. Toujours par l'examen direct, FORSYTH obtient 10 résultats positifs sur 10 cas de tuberculose pulmonaire. KURASCHIGE, en se servant de la technique à l'antiformine, trouve 100 p. 100 de résultats positifs dans le sang de 155 tuberculeux pulmonaires; STURM par l'inoculation au cobaye a 23 cas positifs sur 23 sangs de même nature. SUSUKI et TAKAKI mettent le bacille de Koch en évidence dans le sang de 510 malades

sur 517 tuberculeux, et chez 28 sujets en bonne santé sur 54, par la méthode à l'antiformine et par l'épreuve au cobaye. LIEBERMEISTER a, par la technique à l'antiformine, sur 28 cas de tuberculose pulmonaire, 26 résultats positifs, et 37 chez des rhumatisants. RUMPF, par la même technique, obtient 100 p. 100 de résultats positifs chez 31 tuberculeux et 7 sujets sains. BACMEISTER et RUEBEN font les mêmes constatations, en particulier chez 8 personnes en bonne santé. KENNER-KNECHT met en évidence des bacilles de Koch chez 68 enfants tuberculeux (100 p. 100 des cas, chez 18 suspects de tuberculose sur 20, et chez 23 non tuberculeux sur 31 ; l'inoculation au cobaye effectuée à 13 reprises a fourni 100 p. 100 de résultats positifs. DUCHINOFF, en inoculant au cobaye le sang de 23 malades atteints de tuberculose chirurgicale, obtient 23 succès. Toujours par la méthode à l'antiformine, E. ROSENBERG décèle des bacilles acido-résistants dans le sang de 18 sujets tuberculeux pulmonaires sur 19, de 2 sur 3 suspects de tuberculose, et de 8 sur 10 atteints de tuberculose chirurgicale.

En France, en dehors de JOUSSET qui considère la bacillémie comme fréquente dans les formes aiguës, et rares dans les formes chroniques de la tuberculose pulmonaire, la bacillémie est considérée comme exceptionnelle par les autres auteurs. BARON, qui a consacré une importante thèse à cette question, arrive aux résultats suivants en employant l'inoculation au cobaye : 4 résultats positifs avec le sang de 7 granulies aiguës généralisées, et 1 cas positif sur 2 tuberculoses aiguës avec lésions cardio-vasculaires. Par contre, dans les tuberculoses aiguës ou chroniques non évolutives, il n'obtient que 2 cas positifs sur 44 malades dont le sang avait été prélevé pour la plupart dans la période préagonique.

« En résumé, dit BARON, dans les tuberculoses autres que la granulie et la tuberculose du système cardio-vasculaire, il peut y avoir bacillémie, mais cette bacillémie est rare,

fugace, et le plus souvent trop peu importante pour pouvoir être décelée. »

Ces recherches, complétées en 1915 par celles de LÉON BERNARD, ROBERT DEBRÉ, et BARON, vite confirmées en France par celles de NOBÉCOURT et DARRÉ, de RIST, ARMAND-DELILLE et LÉVY-BRUHL, et en Amérique par VERBIZIER, ROSENBERG, RAVENEL et SCHMIDT, puis par ANDERSON ; en Allemagne, par BACMEISTER et RUEBEN, KAHN, QUERNER, DREESEN, et enfin par ELSAESSER, avaient semblé mettre de l'ordre dans ce chaos en montrant la rareté de la bacillémie au cours de la tuberculose.

Mais malgré d'innombrables travaux, les divergences d'opinion étaient encore considérables, surtout en ce qui concerne la fréquence de la bacillémie dans la clinique humaine où, par suite de l'insuffisante précision des méthodes techniques généralement employées, les résultats obtenus par les différents expérimentateurs ont été souvent contradictoires. C'est pour cela que la presque unanimité des cliniciens estimaient que la question était loin d'être résolue.

Ce problème était posé dans ces termes quand LOEWENSTEIN, en 1930, fit connaître sa méthode d'hémoculture, au moyen de laquelle il devenait très facile de déceler le bacille de Koch dans le sang. Dès 1930, en se basant sur plus de 5.000 hémocultures pratiquées suivant sa méthode, LOEWENSTEIN affirmait que la bacillémie était très fréquente, souvent même abondante, non seulement chez les phtisiques avérés, mais aussi chez les malades atteints de tuberculoses cutanées, osseuses, articulaires, rénales, oculaires, et même au cours d'autres maladies telles que le rhumatisme articulaire aigu ou chronique, et dans certaines affections du système nerveux, comme la chorée, la démence précoce, la névrite rétro-bulbaire et la sclérose en plaques.

TECHNIQUE DE LOEWENSTEIN

Pour arriver à ces résultats, LOEWENSTEIN a préconisé un nouveau milieu de culture et une technique spéciale de préparation du sang, que nous allons brièvement exposer.

1^o La composition et la sensibilité du milieu de culture étudié précédemment le font préférer à l'heure actuelle aux autres milieux employés pour l'isolement du bacille de Koch. Son utilisation par nos collaborateurs et par d'autres chercheurs, depuis que A. SAENZ l'a introduit dans les laboratoires de recherches sur la tuberculose à l'Institut Pasteur, a constamment donné d'excellents résultats dans l'ensemencement de plusieurs centaines de produits tuberculeux de provenances diverses.

2^o Pour la préparation du sang, parmi les divers procédés préconisés par LOEWENSTEIN, A. SAENZ avait adopté jusqu'en janvier 1933, la technique suivante :

On reçoit dans un tube à essai de 22 millimètres, contenant 3 cm³ d'une solution de citrate de soude à 10 p. 100, 5 ou 10 cm³ de sang prélevé par ponction veineuse aseptique et ainsi rendu incoagulable : on ajoute, après décantation du plasma, 10 à 20 cm³ d'une solution stérile d'acide acétique à 3 p. 100. On laisse en contact pendant 5 minutes et on prélève ensuite, à l'aide d'une boule de Miquel, le sang hémolysé. Celui-ci est versé dans un grand tube centrifugeur de 300 cm³ de capacité, qu'on a préalablement garni de 20 cm³ d'eau distillée. On centrifuge pendant un quart d'heure à 1.500 tours. On rejette le liquide surnageant et on lave le culot globulaire, en l'agitant violemment à l'aide d'une baguette stérile, dans 200 à 250 cm³ d'eau distillée. Ce lavage suivi de centrifugation suffit pour éliminer complètement l'hémoglobine qui, d'après LOEWENSTEIN, empêcherait le développement du bacille de Koch. Si le culot est bien préparé, il prend alors une couleur blanc-grisâtre.

On l'aspire dans une pipette d'assez gros calibre, et on l'ensemence sur 6 à 8 tubes de milieu de LOEWENSTEIN.

Les tubes ensemencés sont portés à l'étuve à 38° en position inclinée à 15°. Si l'on n'y voit apparaître aucune colonie, ce qui est le cas le plus fréquent, il ne faut pas en conclure, d'après LOEWENSTEIN, qu'il ne s'est rien développé. On doit racler soigneusement la surface de ces tubes après des temps variables : huit jours, vingt jours, cinq et douze semaines après l'ensemencement, et examiner les étalements de ces produits de raclage après les avoir fixés et colorés par la méthode de ZIEHL-NEELSEN. Lorsque cet examen est positif, on doit admettre, d'après LOEWENSTEIN, que le bacille tuberculeux est présent dans l'échantillon de sang avec lequel l'hémoculture a été pratiquée.

Voici un résumé des résultats obtenus jusqu'en 1932 par LOEWENSTEIN et ses collaborateurs à Vienne :

Auteurs	Nature de la maladie	Nombre de cas examinés	Résultats positifs
Loewenstein.....	Tuberculoses pulmonaires.	140	54
Loewenstein.....	Tuberculoses cutanées.	347	117
Loewenstein.....	Tuberculoses laryngées.	47	26
Loewenstein.....	Tuberculoses rénales.	22	13
Loewenstein.....	Tuberculoses osseuses.	18	9
Loewenstein.....	Tuberculoses oculaires.	4	3
Loewenstein.....	Rhumatisme articulaire aigu.	27	22
Loewenstein.....	Erythème noueux.	14	12
Loewenstein.....	Chorée.	9	5
Loewenstein.....	Névrite rétro-bulbaire.	6	4
Loewenstein.....	Sclérose en plaques.	40	17
Loewenstein.....	Schizophrénie.	24	9
Fischer.....	Tuberculoses pulmonaires.	62	26
Fischer.....	Tuberculoses osseuses.	15	5
Fischer et Urgoiti.....	Tuberculoses diverses.	615	253
Jérusalem et Urgoiti....	Tuberculoses extra-pulmonaires.	60	10
Urgoiti.....	Tuberculoses ostéo-articulaires.	67	26
Wessely et Loewenstein..	Tuberculoses laryngées.	47	26
Kren et Loewenstein....	Tuberculoses cutanées.	51	38
Loewenstein et Ruseff...	Tuberculoses miliaires.	23	23
Loewenstein et Ruseff...	Méningites tuberculeuses.	8	6
Loewenstein et Ruseff...	Tuberculoses chirurgicales	17	6
Loewenstein et Ruseff...	Tuberculoses du poumon	98	10
Kissmeyer et Loewenstein	Lésions cutanées non diagnostiquées.	82	56
Reitter et Loewenstein..	Rhumatisme articulaire aigu.	52	22
Konrad.....	Tuberculoses cutanées.	23, 8 p. 100	—
Kissmeyer et Loewenstein	Lupus vulgaris.	6	—
Kissmeyer et Loewenstein	Lupus érythémateux.	21	—
Kissmeyer et Loewenstein	Adénites tuberculeuses.	18	—
Kissmeyer et Loewenstein	Sarcoides de Boeck	50	—
Kissmeyer et Loewenstein	Tuberculoses colliquatives.	40	—
Kissmeyer et Loewenstein	Tuberculides.	—	—

Ces résultats concernant les différentes formes de tuberculose peuvent se résumer ainsi : 100 p. 100 d'hémocultures positives dans les formes aiguës ou miliaires de tuberculose pulmonaire, intestinale ou méningée, 80 p. 100 dans les cas de tuberculose chronique évolutive, 55 à 60 p. 100 dans la tuberculose rénale ou laryngée, 43 p. 100 dans la tuberculose dite chirurgicale avec bon état général et apyrexie, 41 p. 100

dans les tuberculoses fibreuses ou latentes du poumon. Dans les polyarthrites aiguës (maladie de BOUILLAUD) ou chroniques, 70 p. 100 de résultats positifs ; dans les affections du système nerveux (chorée, névrite rétro-bulbaire, sclérose en plaques, démence précoce), 50 p. 100.

Ces pourcentages ont été maintenus tout dernièrement encore par LOEWENSTEIN sur un total de 18.000 hémocultures. Les derniers chiffres donnés par cet auteur et son collaborateur REITTER, concernant les polyarthrites aiguës ou chroniques, sont vraiment impressionnants ; ils auraient obtenu, sur 3.000 hémocultures pratiquées, non moins de 70 p. 100 de résultats positifs. Dans les liquides céphalo-rachidiens de choréiques et de déments précoces, LOEWENSTEIN a réussi à mettre en évidence le bacille de Koch par le simple examen direct et la culture ; il affirme de même avoir décelé parfois des bacilles acido-résistants en très grande abondance chez les malades atteints de démence précoce, de lupus érythémateux et d'érythème induré de BAZIN, par l'examen direct du culot sanguin coloré par la méthode de ZIEHL-NEESEN.

En ce qui concerne les types de bacilles isolés par LOEWENSTEIN et ses collaborateurs, il faut remarquer que cette identification s'est limitée presque toujours au seul examen microscopique, fait après des délais variables, des produits de raclage des tubesensemencés et quelquefois aussi à la détermination des types des bacilles des mammifères, dans les cas où l'on obtenait le développement de colonies macroscopiques visibles. Dans un nombre réduit de cas, l'étude des bacilles isolés a montré qu'il s'agissait de bacilles de type humain, ou très rarement bovin. Ce dernier a été trouvé surtout dans des tuberculoses osseuses. Le type aviaire a été signalé également dans une importante proportion de cultures isolées de lésions tuberculeuses de la peau.

A. SAENZ et nous-même avons eu l'occasion à 2 reprises d'identifier des cultures isolées dans le laboratoire de LOE-

WENSTEIN à Vienne et provenant de malades atteints de rhumatisme et de démence précoce ; nous avons pu constater que les souches envoyées étaient des bacilles tuberculeux virulents appartenant au type humain.

Disons tout de suite que ces résultats, publiés par LOEWENSTEIN et ses collaborateurs, n'ont pu être que très partiellement confirmés dans les nombreux laboratoires qui ont appliqué sa méthode d'hémoculture.

Les modifications successives que l'auteur a introduites dans la formule du milieu, à 4 reprises en deux ans, et dans les diverses phases de traitement du culot de centrifugation à ensemençer — ces changements n'étaient basés d'ailleurs sur aucune raison théorique ou expérimentale valable —, ont provoqué des critiques et des discussions très vives dans les sociétés savantes.

Comme l'ont tout récemment fait remarquer Robert DEBRÉ, A. SAENZ et ROBERT BROCA si, après les premiers travaux de LOEWENSTEIN, on pouvait croire que la conception même de la tuberculose allait être profondément remaniée, des recherches de contrôle ne tardèrent pas à ralentir cet élan.

Parmi les auteurs qui se sont attachés à contrôler les résultats fournis par LOEWENSTEIN et ses collaborateurs, A. SAENZ a été le premier en France à entreprendre dès 1930 leur vérification, après s'être initié aux détails de cette technique dans le propre laboratoire de ce savant à Vienne.

A. SAENZ a pratiqué, de septembre 1930 jusqu'à juillet 1934, plus de 936 hémocultures dont une partie avec notre collaboration, ce qui représente environ 5.700 tubes ensemençés. Les échantillons de sang provenaient de sujets suspects de tuberculose ou atteints de rhumatisme ou de maladies nerveuses des services du Professeur L. SAYÉ, à Barcelone, des Professeurs ou Docteurs ROBERT DEBRÉ, SERGENT, LÉON BERNARD, LEMIERRE, WEILL-HALLÉ, BEZANÇON, HOCQUART, CHEVALLIER, ABRAMI, ARMAND-DELILLE,

CLAUDE, LAIGNEL-LAVASTINE, LAEDERICH, COSTE et MOZER etc.

Avant d'indiquer nos résultats, ainsi que ceux des auteurs étrangers qui ont contrôlé la méthode de LOEWENSTEIN, nous allons étudier ses bases expérimentales et les erreurs grossières auxquelles peut conduire l'application de cette technique.



BASES EXPÉRIMENTALES DE LA MÉTHODE DE LOEWENSTEIN

L'étude expérimentale de la méthode de l'auteur viennois a permis de nous rendre compte, en premier lieu, que la technique primitive de LOEWENSTEIN permet le développement, parfois même très tardif, de bacilles acido-résistants saprophytes.

Les bacilles paratuberculeux ont disparu dès qu'on a remplacé l'acide acétique par l'acide sulfurique comme agent d'hémolyse dans le sang ensemencé.

A. SAENZ, en collaboration avec M. SADETTIN et nous-même, a pu vérifier expérimentalement par l'étude de la toxicité comparative de ces deux acides pour les bacilles paratuberculeux, que la pullulation des saprophytes acido-résistants était due au fait que l'acide acétique est fort peu ou pas du tout toxique pour les bacilles paratuberculeux.

Ces constatations sont tirées de l'expérience suivante :

Nous avons préparé séparément, dans du liquide de SAURON dilué au 1/4, des suspensions de bacilles paratuberculeux provenant de cultures âgées de 15 à 20 jours, sur pomme de terre glycélinée.

Ces suspensions, contenant 50 mgr. de bacilles pesés à l'état humide, non essorés, par $0,5 \text{ cm}^3$, sont ensuite mélangées à $4,5 \text{ cm}^3$ de solutions d'acide acétique de 5 à 20 p. 100 en volume. Après une demi-heure de contact, on se débarrasse de l'acide au moyen de trois centrifugations et lavages successifs avec du liquide de SAURON stérile, et on contrôle la neutralité du dépôt après le dernier lavage, avec quelques

gouttes de teinture de tournesol. On dilue en sérum physiologique les bacilles ainsi traités, de façon à obtenir des dilutions à des concentrations variant de 0,001 à 0,000.01 mgr. par cm³. 1cm³ de chacune de ces dilution est ensuite réparti à la surface de deux tubes de milieu de LOEWENSTEIN. Dans chaque expérience, nous avonsensemencé à titre de témoins des bacilles non traités (2 tubes par concentration). Une technique identique a été employée pour l'étude de l'action de l'acide sulfurique.

Voici les résultats obtenus :

Souche Bl...		Traités par l'acide acétique à			
Quantité de Bacilles ensemencés	Témoins Nombre de colonies	5 p. 100	10 p. 100	15 p. 100	20 p. 100
0,001 mgr.....	innombrables	46	6	0	0
0,0001 mgr.....	—	3	0	0	0
0,00001 mgr....	—	4	0	0	0

		Traités par l'acide sulfurique à		
		10 p. 100	15 p. 100	20 p. 100
0,001 mgr.....	innombrables	0	0	0
0,0001 mgr.....	200	0	0	0
0,00001 mgr....	150	0	0	0

La lecture de ce tableau montre que les bacilles paratuberculeux à la concentration de 0,001 à 0,000.01 de mgr. ont résisté pendant une demi-heure à l'action de l'acide acétique à 5 p. 100. De même, pour les émulsions contenant 0,001 de mgr., l'acide acétique a permis le développement de ces bacilles à la concentration de 10 p. 100. Ces faits contrastent avec l'action de l'acide sulfurique, qui a empêché

tout développement des bacilles paratuberculeux à des concentrations de 10 à 20 p. 100.

Ces expériences nous ont donc permis de conclure que si l'acide sulfurique s'est révélé très toxique pour les souches de bacilles paratuberculeux, par contre, l'acide acétique n'exerçait aucune action empêchante dans les mêmes conditions.

En second lieu, dans sa méthode d'hémoculture, LOEWENSTEIN libère l'hémoglobine des globules rouges, en prétendant qu'elle est empêchante pour le développement du bacille de Koch ; dans une série de recherches A. SAENZ et M. SADETTIN ont pu constater qu'elle n'exerçait aucune action nuisible sur ce germe.

Ces auteurs étudient l'influence du sang « in toto », et celle de chaque fraction (plasma, globules rouges, sérum citraté du sang humain normal ou de malade tuberculeux, de mouton, de lapin normal ou vacciné par le B. C. G. ou tuberculeux), sur le développement des bacilles cultivés dans le milieu de SAUTON. Ils sont ainsi parvenus à des résultats différents suivant la souche de bacilles tuberculeux ensemencés. En effet, pour le B. C. G. la quantité de corps microbiens, développés dans 125 cm³ de liquide de SAUTON restés pendant 25 jours à l'étuve à 38°, était sensiblement la même que dans les ballons auxquels on avait ajouté 1 à 5 cm³ de sang provenant de sujets sains ou tuberculeux, de moutons et de lapins neufs ou vaccinés par le B. C. G. ou infectés avec des bacilles virulents. Cependant, on a constaté une action nettement favorisant de l'extrait globulaire préparé selon la formule de LEGROUX. Le poids des corps microbiens, développés par ballon témoin et pesés à l'état sec, a été en moyenne de 1 gr. 40, tandis que les ballons ayant reçu 1 à 5 cm³ d'extrait globulaire ont donné 1 gr. 60 à 1 gr. 70 de bacilles dans les mêmes conditions.

En ce qui concerne les cultures de bacilles du type bovin, si l'extrait globulaire et le sang de lapin tuberculeux ou

vacciné avec le B. C. G. et de mouton ne se sont pas révélés nettement favorisants, par contre le sang de sujets sains ou atteints de tuberculose, le sang de lapin et de mouton se sont montrés légèrement empêchants pour le développement de la souche employée (Bovine VALLÉE).

Pour les souches de bacilles humains (RATTI ou aviaires (Aviaire IV)), on a constaté que le sang et l'extrait globulaire favorisent nettement la culture de ces types. Dans certaines séries, le développement des corps microbiens en Sauton au sang a atteint presque le double de celui des ballons témoins.

En résumé, l'action du sang est indifférente pour la souche de CALMETTE et GUÉRIN, et, dans certaines conditions, légèrement empêchante pour le développement des bacilles d'origine bovine. En ce qui concerne les souches d'origine humaine ou aviaire, ces observations sont tout à fait opposées à celles de LOEWENSTEIN, puisqu'elles ont montré que le sang favorise la culture de ces types bacillaires.

Des constatations identiques ont été faites par NINNI et BRETEY sur ce même sujet. En outre, il nous est arrivé d'obtenir un développement très abondant de belles colonies de bacilles de type humain dans tous les tubesensemencés directement, sans préparation préalable, avec le sang liquide total extrait du cœur d'un sujet mort de tuberculose chronique évolutive.

D'autre part, A. SAENZ avec nous-même avons réalisé une expérience qui prouve que, contrairement aux dires de LOEWENSTEIN, l'hémoglobine est loin d'empêcher le développement du bacille de Koch, même si on l'extrait directement du sang de sujets morts de tuberculose.

Après avoir flambé à l'aide d'un brûleur le péricarde mis à nu d'un cœur de malade tuberculeux, nous en avons ouvert aseptiquement le ventricule et l'oreillette droits et nous avons trouvé un volumineux caillot constitué de deux parties nettement différenciées par leur couleur. La partie

supérieure blanche occupait environ un tiers du volume, et la partie inférieure rouge les deux autres tiers. Les frottis de ces deux parties montraient que le caillot blanc ne renfermait que des globules blancs et de la fibrine, tandis que la partie rouge-noir était composée presque exclusivement de globules rouges et de fibrine avec quelques rares leucocytes.

Nous avons alors prélevé, à l'aide d'instruments stériles, changés pour chaque opération, 1 gramme, pesé à la balance, de la partie supérieure (caillot blanc), et 1 autre gramme de la partie inférieure (caillot rouge), qui ont été mis séparément dans des mortiers stériles. Chaque caillot, coupé en fins morceaux puis broyé avec du sable, fut traité ensuite par 2 cm³ d'acide sulfurique à 15 p. 100 pendant 15 minutes. On neutralisa en présence de tournesol (réactif indicateur) avec une solution de soude à 30 p. 100. Chaque caillot futensemencé entièrement sur 6 tubes de milieu de LÖEWENSTEIN à raison de 1/2 cm³ partube. Voici les résultats obtenus :

Dans les tubesensemencés avec le caillot rouge, il s'est développé au total 109 colonies de bacilles tuberculeux de type humain, tandis que dans ceuxensemencés avec le caillot blanc il n'y en eut que 39 dans le même temps (30 jours).

Une deuxième expérience, effectuée avec un autre cœur de sujet tuberculeux (Joq...) dans les mêmes conditions que précédemment, nous a donné :

Caillot rouge.....	19 colonies
Caillot blanc.....	2 colonies

Ces faits ont été confirmés par les inoculations au cobaye.

En effet, dans les mêmes conditions, les cobayes qui avaient reçu le caillot rouge ont fait une tuberculose mortelle à marche beaucoup plus rapide que ceux inoculés avec le caillot blanc.

Ces deux expériences et d'autres semblables démontrent

que l'hémoglobine n'exerce aucune action empêchante sur le développement du bacille de Koch, puisque ce sont les fragments de caillot rouge-noir qui ont toujours fourni le plus grand nombre de colonies. Elles apportent, en outre, la preuve que, contrairement à ce qu'ont écrit quelques auteurs qui s'étaient crus autorisés à admettre que, dans le sang circulant, le bacille de Koch devait être cantonné dans les leucocytes, c'est en dehors de ceux-ci qu'ils sont les plus nombreux. Il est, du reste, expérimentalement établi que lors des surinfections — et c'est le cas pour le sang des sujets tuberculeux — le principal élément de défense qui intervient vis-à-vis des bacilles tuberculeux introduits dans l'organisme est représenté par les éléments cellulaires du système réticulo-endothélial. Dans le sang circulant, ces éléments ne sont qu'en nombre relativement minime : 1 à 3 p. 100 ; ceci explique pourquoi on rencontre beaucoup plus de bacilles dans la portion rouge-noir du caillot, représentant la masse totale du sang, que dans la portion blanche qui n'est qu'une de ces fractions.

Avant d'appliquer la méthode à la clinique humaine, nous avons infecté artificiellement, avec une dilution allant du 1/10.000^e au 1/1.000.000^e de milligramme, des sangs de sujets sains et de malades tuberculeux.

Ces sangs, rendus incoagulables et simplement laqués, ont été ensemencés à des époques différentes sur le milieu de LOEWENSTEIN, et ils ont donné par la suite de très belles cultures, avec sensiblement le même nombre de colonies par tube que les témoins.

D'un autre côté, A. SAENZ ayant pratiqué l'ensemencement du sang d'un malade atteint de tuberculose chronique non évolutive dans la période préagonique et l'ensemencement du sang du cœur du même sujet après sa mort, a obtenu deux résultats négatifs. Par contre, deux cultures furent positives en partant du sang d'un sujet vivant et du caillot sanguin du cœur du même sujet ayant succombé

à une tuberculose généralisée progressive aiguë. Ainsi, l'opinion de WALTER et HORNING, qui prétendent que le sang vivant exercerait une influence inhibitrice sur le bacille tuberculeux, tandis que celle-ci manquerait dans le sang de sujet mort, ne se trouve pas confirmée.

Nous venons de prouver par ces expériences variées et nombreuses que l'action prétendue empêchante de l'hémoglobine à l'égard du bacille de Koch n'existe pas.

RÉSULTAT DE LA PREMIÈRE SÉRIE D'HÉMOCULTURES PRATIQUÉES PAR A. SAENZ EN 1931 ET 1932

Les résultats de 300 hémocultures ont été communiqués par A. SAENZ à la Société de Biologie en juillet 1931 ; 18 résultats positifs de bacilles acido-résistants avaient alors été obtenus, soit 6 p. 100.

Ensuite, il a étudié dans les mêmes conditions 200 nouveaux sangs. Il a ainsiensemencé au total dans cette première série d'expériences plus de 3.000 tubes du milieu de LOEWENSTEIN.

Sur les 200 derniers sangs, il n'a enregistré que 8 résultats positifs, soit 4 p. 100. Au total, sur les 500 malades étudiés dans cette première série, il a obtenu 9 cultures macroscopiques d'emblée, sept fois dans un seul tube sur les 6ensemencés, et deux fois dans deux tubes. Ces colonies étaient visibles une fois le 12^e jour, 2 fois le 19^e, et pour tous les autres sujets, entre le 30^e et le 40^e jour après l'ensemencement.

Dans 17 cas, il s'agissait de micro-colonies décelables seulement sur les frottis colorés au Ziehl, et dont la valeur et la signification seront discutées ultérieurement. Une seule fois, ces micro-colonies ont donné lieu à un développement de colonies macroscopiquement visibles par réensemencement sur milieu de LOEWENSTEIN.

Identification des types de bacilles isolés par A. Saenz dans ses premières séries d'hémocultures

A. SAENZ a réussi, tant par les réactions biologiques que par l'inoculation, à identifier les types de bacilles isolés. Dans trois cas il s'est agi de bacilles présentant les caractères des paratuberculeux ; dans un cas, d'un bacille de type aviaire isolé du sang d'un malade atteint de tuberculose ostéo-articulaire, et dans tous les autres de bacilles de type humain isolés de tuberculoses pulmonaires ou osseuses.

Les 9 souches, dont il a obtenu des colonies macroscopiques d'emblée, comprennent trois paratuberculeux : le nombre total de ces résultats positifs macroscopiques se trouve donc réduit de 30 p. 100 et ramené à 1,2 p. 100 pour l'ensemble.

Les bacilles paratuberculeux provenaient de malades atteints de diverses formes d'infection tuberculeuse typique, pulmonaire, osseuse ou cutanée. Pour 2 de ces malades, la culture est devenue visible sur un des 6 tubes ensemencés au bout de 12 jours pour l'un (souche Bl.) et de 53 jours (souche Pr.) pour l'autre. Pour le troisième (Ya.) les colonies ont apparu dans 2 tubes sur 6 au bout de 38 jours.

Les caractères de ces 3 souches étaient les suivants :

Sur milieu de LOEWENSTEIN à l'œuf-asparagine, petites colonies blanches, porcelainées, saillantes et mamelonnées, non pigmentées, légèrement humides. Réensemencées sur le même milieu, elles ont formé une couche continue, granuleuse, épaisse, ne se différenciant des bacilles du type mammifère que par le développement plus rapide des cultures-filles ; celui-ci était complet en 10 à 12 jours.

Les 3 souches ont poussé difficilement et lentement dans les premières cultures sur milieux non glycerinés, puis, après plusieurs mois, elles ont fini par s'y adapter. Dès les premiers réensemencements on a pu constater qu'elles crois-

saient entre 20° et 42°, mais que leur température optima était comprise entre 32° et 35°. Ensemencées en bouillon glycérimé, celui-ci reste clair : aucun pigment ne diffuse dans le liquide. Après plusieurs jours apparaît un voile blanc, plissé, qui adhère aux parois du tube. Sur le milieu de PETRAGNANI modifié par substitution de l'asparagine à la peptone, et sur pomme de terre glycérimée, les cultures sont complètement développées en douze à quinze jours d'étuve, et ont le même aspect que celles du bacille tuberculeux du type mammifère.

Inoculées sous la peau, dans le péritoine ou dans les veines de lapins, cobayes, rats et souris, ces 3 souches ne produisent aucune lésion. La poule est indifférente aux doses massives injectées dans le péritoine ou dans les veines. Sous la peau du cobaye, 5 à 10 milligrammes déterminent une adénite de voisinage ou un abcès local qui guérit spontanément après quelques semaines, et dont le pus montre des bacilles acidorésistants très nombreux. Parfois on trouve un ganglion sous-lombaire volumineux, contenant des bacilles 20 à 30 jours après l'inoculation, mais jamais de pus caséeux. Les viscères sont toujours indemnes, et les nodules que produit l'injection intra-péritonéale de 1 à 10 milligrammes chez le cobaye disparaissent totalement en soixante à quatre-vingt-dix jours. L'injection intraveineuse de 1 à 10 milligrammes est inoffensive. Les fortes doses provoquent seulement un peu d'hypertrophie passagère du foie et de la rate.

Par leurs caractères biologiques et par l'absence totale de propriétés pathogènes, il est évident que ces 3 souches doivent être considérées comme appartenant au groupe des bacilles paratuberculeux. Ce fait est confirmé par l'étude de leurs fonctions antigènes et toxiques. Mais les bacilles ainsi isolés proviennent-ils du sang des malades ou d'une contamination accidentelle pendant les manipulations ?

La deuxième hypothèse fut écartée, parce que les souches

obtenues diffèrent totalement, par leur aspect et par certains de leurs caractères, de celles des paratuberculeux qui se trouvent dans le laboratoire. C'est en raison de ces constatations qu'on a cru pouvoir affirmer leur origine hématogène.

D'ailleurs LOEWENSTEIN, TIEDEMANN, POPPER, LYDIA RABINOWITSCH, PEARCE, KUSTER et OLBRICH ont confirmé ces résultats en arrivant à des conclusions identiques.

En ce qui concerne la souche de bacille aviaire isolée par A. SAENZ, bien que les recherches de LOEWENSTEIN à ce sujet soient déjà anciennes (1910) et qu'il en ait été publié de semblables par d'autres auteurs, certains expérimentateurs (1) se sont demandé si les œufs que nous employons pour fabriquer nos milieux de culture ne contenaient pas de bacilles acido-résistants qu'un chauffage insuffisant aurait épargnés. Cette objection n'avait pas échappé à A. CALMETTE, à A. BOQUET et à A. SAENZ, qui ont jugé indispensable d'élucider ce point.

Dans ce but, A. SAENZ a incorporé au milieu à l'œuf, avant de le coaguler, des bacilles paratuberculeux, des bacilles aviaires et des bacilles bovins à la dose de 1 milligramme par centimètre cube. Une partie des tubes a été chauffée à 75° pendant une demi-heure une seule fois ; une autre série à 85° à deux reprises pendant une demi-heure et à 24 heures d'intervalle ; une troisième série, trois fois à 75° pendant une demi-heure à 24 heures d'intervalle. Ces tubes portés à l'étuve à 38° ont été observés pendant trois mois. Sur 150 tubes, aucun n'a présenté de culture macroscopique. De plus, pour le bacille des mammifères, le milieu qui n'avait pas donné de culture macroscopique après trois mois a été broyé et inoculé à un lot de cobayes. Ces animaux, observés pendant quatre mois, n'ont jamais réagi à la tuberculine, et, sacrifiés, n'ont présenté aucune trace de tuberculose à l'autopsie. S'il existe une cause

(1) Lichtenstein et Paltauf ont trouvé que 10 p. 100 des œufs du commerce étaient contaminés.

Auteurs	Nature de la maladie	Nombre des hémocultures	
		effectuées	positives
Abt	Tuberculoses diverses	20	4
Armand-Delille et Manseau ..	Tuberculoses pulmonaires	15	1
Besseau	Tuberculoses diverses	60	2
Bingold et Spier	Tuberculoses diverses	15	0
Bruynoghe et Adant	Tuberc. graves évolutives	8	3
Busson	Tuberculoses diverses	150	26
Cohn	Tuberculoses diverses	28	0
Cummings	Tuberculoses avérées	15	0
D'Antona	Tuberculoses diverses	30	0
Deist	Tuberculoses diverses	231	3
Dettling	Tuberc. diverses et maladies non tuberculeuses	115	0
Dimtza et Guscher	Tuberculoses pulmonaires	11	1
Di Natale	Tuberculoses pulmonaires	112	9
Domingo	Tuberculoses certaines	192	8
Ederle et Kriech	Tuberculoses miliaires	4	2
Ederle et Kriech	Tuberculoses pulmonaires	30	2
Eichbaum	Tuberc. pulm. très avancées	20	0
Giannetti	Tuberculoses diverses	23	0
Hager	Tuberculoses diverses	163	17
Haymaker, Ekhart et Freund ..	Tuberculoses diverses	38	0
Haymaker, Ekhart et Freund ..	Maladies diverses	13	0
Huttig	Tuberculoses pulmonaires	59	8
Izard et Thiry	Divers tuberculeux avérés	13	0
Jonofsohn	Tuberculoses pulmonaires	41	3
Jonofsohn	Tuberculoses chirurgicales	9	0
Kadish	Tuberculoses diverses	66	0
Kallos	Tuberculoses diverses	37	0
Koch	Tuberculoses diverses	25	0
Lang	Tuberculoses diverses	91	4
Lévin	Tuberculoses pulmonaires	140	2
Lichtenstern	Tuberc. rénales débutantes	3	1
R. et S. Mach	Tuberculoses pulmonaires	60	6
Manteufel	Tuberculoses diverses	30	0
Mathiesen	Tuberculoses diverses	51	7
Muggia	Tuberc. diverses et maladies non tuberculeuses	4	0
Nanu, Jonesco et Stefanescu ..	Tuberc. pleuro-pulmonaires	21	2
Œkonomopoulo et collab.	Tuberc. diverses et maladies non tuberculeuses	18	0
Oro	Tuberc. diverses et maladies non tuberculeuses	27	4
Paraf et Abaza	Tuberculoses pulmonaires	52	2
Poltak	Tuberculoses diverses	35	5
Popper et collaborateurs ...	Tuberculoses diverses	228	11
Rabinowitsch	Tuberculoses pulmonaires	242	10
Richter	Tuberculoses diverses	43	3
Saegler	Tuberculoses diverses	158	11
Schreiner	Tuberculoses diverses	29	0
Schwabacher	Tuberc. pulmonaire et chroniques	11	1
Sergent, Durant, Gaspard et Marcoux	Tuberculoses diverses	30	5
Shapiro	Tuberculoses diverses	167	7
Unverricht et Dosquet	Tuberculoses diverses	91	4
Urbanek et Meller	Diverses maladies des yeux	70	1
Walter et Horing	Tuberc. diverses et maladies non tuberc.	91	0
Weatherail	Tuberculoses pulmonaires	30	0
		3.264	174

Pourcentage : 49 auteurs, 5,33 ; A. Saenz : 5,2.

d'erreur dans les résultats obtenus par la méthode de LOEWENSTEIN, ces recherches permettent donc d'affirmer qu'elles ne proviennent certainement pas du milieu de culture.

Avant d'interpréter les résultats obtenus par A. SAENZ, nous allons les comparer avec ceux enregistrés par d'autres auteurs. Bien entendu, dans le pourcentage total nous tiendrons compte des résultats macroscopiques et microscopiques.

Le tableau ci-dessus montre que 49 expérimentateurs différents, qui ont pratiqué dans l'ensemble 3.264 hémocultures selon la méthode de LOEWENSTEIN, n'ont obtenu, en faisant état des macrocultures et des microcultures, que 174 résultats positifs, soit 5,33 p. 100. Il est donc surprenant de constater la concordance de ces chiffres avec ceux donnés par A. SAENZ sur 500 hémocultures, 5,2 p. 100, et la discordance qu'ils présentent avec ceux indiqués par LOEWENSTEIN et ses collaborateurs.

CAUSES D'ERREURS AUXQUELLES PEUT DONNER LIEU LA MISE EN PRATIQUE DE LA MÉTHODE D'HÉMO- CULTURE DE LOEWENSTEIN.

La question des microcultures non repiquables.

Dans l'interprétation des résultats obtenus, il faut tenir compte de la question encore si obscure des microcultures non repiquables. D'après nos expériences, elles constituent une cause d'erreur grossière quand on fait état de leur présence pour affirmer la nature tuberculeuse d'un sang ensemencé.

Nous avons vu précédemment que LOEWENSTEIN conseille de racler les tubes de culture ensemencés avec le culot du sang, lorsque, après un séjour de 6 semaines à l'étuve, on n'observe pas le développement de colonies macroscopiques. Les étalements de ces produits de raclage après fixation et coloration au Ziehl-Neelsen doivent être examinés pour rechercher la présence de bacilles acido-résistants. Lorsque l'examen est positif, on doit admettre, d'après LOEWENSTEIN, que des bacilles tuberculeux sont présents dans l'échantillon de sang duquel on est parti pour pratiquer la culture. En consultant la littérature consacrée à l'hémoculture, on constate qu'un grand nombre de chercheurs fondent leurs résultats positifs sur ces microcultures, qui ne sont pas repiquables et ne tuberculisent pas le cobaye.

Dans l'interprétation de ces résultats par « microcolonies non repiquables », nous devons avoir constamment présents à l'esprit les faits rapportés par CORNET, MEYER, GOTTSTEIN,

KAHN, et tout dernièrement par WILSON et SCHWABACHER, qui nous ont mis en garde contre l'interprétation des examens microscopiques de sédiments sanguins : les particules des membranes des hématies et les granulations leucocytaires, à cause de leur richesse en lipoides, sont acido-résistantes, et leur grande similitude avec le bacille de Koch, tant par leur forme que par leur constitution chimique, peut donner lieu à de grossières erreurs, faits que nos recherches sur ce point ont pleinement confirmés.

Et surtout, il importe de nous mettre en garde contre la fréquence des bacilles saprophytes acido-résistants dans les divers produits chimiques, réactifs, colorants, utilisés par les travailleurs des laboratoires où l'on s'occupe de tuberculose.

Ces constatations et d'autres faits déjà bien connus relatifs aux précautions qu'il faut prendre avec l'huile de cèdre, les lentilles frontales des objectifs à immersion, les lames porte-objets, les solutions de matières colorantes, etc., nous portent à penser qu'il a dû fréquemment arriver que de tels éléments bacillaires, simplement colorés au Ziehl pour l'examen direct, ont été pris pour de véritables bacilles tuberculeux.

De notre côté, nous avons pu déceler des bacilles acido-résistants saprophytes dans l'eau physiologique et dans l'eau distillée non stérilisée. Les expériences faites avec A. SAENZ, que nous rapportons ci-dessous, montrent nettement l'ubiquité des bacilles acido-résistants.

Nous avons raclé avec un bistouri neuf et stérilisé l'intérieur de 10 tuyaux de caoutchouc, dits antigicleurs, adaptés aux robinets d'eau froide de 10 laboratoires du Service des Recherches sur la Tuberculose. Ces produits de raclage ont été délayés, séparément, dans des godets coniques neufs et stériles, préalablement lavés à l'alcool et à l'éther. Les émulsions ainsi obtenues ont été ensuite centrifugées et décantées, puis les culots furent étalés sur

des lames neuves et colorés au Ziehl-Neelsen. Les résultats de cet examen ont été les suivants : dans un cas, très nombreux amas de bacilles acido-résistants, le champ microscopique en est littéralement couvert ; dans 6 cas, nombreux amas de bacilles acido-résistants ; dans 1 cas, quelques amas et, dans le dernier cas, aucun bacille acido-résistant visible. Dans certains cas, les bacilles acido-résistants sont tellement abondants qu'un simple examen direct après coloration au Ziehl-Neelsen suffit pour les déceler en très grand nombre.

La même recherche pratiquée sur les antigicleurs des robinets à eau chaude a montré une fois de très nombreux amas de bacilles acido-résistants, quatre fois de nombreux amas, deux fois quelques amas ; dans 2 cas l'examen a été négatif.

L'ensemencement du culot des godets, correspondant aux antigicleurs des robinets à eau froide, par la méthode que nous avons préconisée pour l'isolement des produits suspects secondairement infectés nous a permis d'obtenir à deux reprises des cultures de bacilles acido-résistants, pigmentés dans un cas et non pigmentés, de couleur blanc-nacré, dans l'autre. L'absence totale de propriétés pathogènes pour le cobaye, le lapin et la poule de ces 2 souches, et leurs caractères biologiques nous ont permis de les classer parmi les bacilles paratuberculeux.

En présence de ces résultats, nous avons voulu savoir si les bacilles paratuberculeux trouvés provenaient réellement du caoutchouc des antigicleurs souillés par des poussières de l'air ou d'une contamination de l'eau du robinet. La deuxième hypothèse a été confirmée par l'expérience suivante : 50 cm³ d'eau prise directement à un robinet sans antigicleur sont centrifugés pendant une demi-heure dans des godets stériles. On rejette ensuite une partie du liquide, et on traite les quelques centimètres cubes restants (3 cm³ environ) par le même volume d'acide sulfurique à 15 p. 100,

on neutralise et onensemence sur 6 tubes du milieu à l'œuf-asparagine, à raison de $1/2$ cm³ par tube ; 3 de ces tubes déposés à l'étuve sont demeurés stériles après un délai de trois mois. Par contre, les 3 autres, laissés à la température du laboratoire, ont donné lieu 45 jours plus tard au développement de colonies blanc-nacré de bacilles acido-alcool-résistants. Ces bacilles se sont nettement montrés avirulents pour les animaux de laboratoire.

D'autres recherches nous ont fait découvrir des cadavres de bacilles acido-résistants dans notre eau distillée et dans notre liquide de Sauton stérile. La présence de ces germes s'explique par ce fait que les billes de verre ou d'acier et la grenaille de plomb employées pour le nettoyage de la verrerie de nos laboratoires retiennent à leur surface des bacilles acido-résistants morts provenant des manipulations antérieures. On les y retrouve souvent en très grand nombre, et ils restent fixés sur les parois des ballons ou passent dans le contenu liquide de ces vases.

Ces constatations nous ont convaincu que les microcolonies non repiquables recueillies par raclage des tubes de milieuensemencés avec du sang sont le plus souvent constituées par de simple amas de cadavres de bacilles acido-résistants apportés par les divers liquides employés pour le traitement préalable des produitsensemencés.

Nous pensons que dans les recherches concernant l'isolement du bacille de Koch à partir du sang, il ne faut tenir compte que des microcolonies cultivables par réensemencement et de celles qui se montrent tuberculeigènes pour le cobaye.

Nous avons donné précédemment comme résultat global de 3.264 hémocultures effectuées par 50 auteurs différents un pourcentage de résultats positifs (macro et microcultures) de 5,33 p. 100. D'après nos recherches, si nous ne faisons plus état des microcultures non repiquables, ce pourcentage diminue encore dans des proportions considérables.

Nous avons donc déduit des hémocultures pratiquées par A. SAENZ un nouveau pourcentage en ne comprenant plus que des macrocultures, et nous l'avons comparé avec les résultats de 62 nouveaux auteurs, qui sont consignés dans les tableaux ci-joints.

Ces chiffres mettent en relief que sur 4.518 hémocultures effectuées par 53 auteurs chez des tuberculeux, on a eu 50 cultures de bacilles de Koch, soit 1,10 p. 100 de résultats positifs.

D'un autre côté, 767 hémocultures pratiquées chez des rhumatisants aigus ou chroniques n'ont fourni que 5 résultats positifs, et 348ensemencements chez des malades atteints de démence précoce n'ont donné que des résultats négatifs.

Si on réunit le nombre des hémocultures pratiquées par les 62 auteurs différents, nous arrivons à un total de 5.633 échantillons de sang ensemencés, qui ont donné 55 résultats positifs, ce qui fait un pourcentage de 0,97 p. 100. Comme nous le verrons plus loin, il est donc impressionnant de constater la concordance de ces résultats avec ceux que A. SAENZ a obtenus avec notre collaboration, sur un total de 936 hémocultures, et qui fournissent un pourcentage de 1,2 p. 100.

*Hémocultures pratiquées dans diverses formes
de tuberculoses. Nouvelles séries*

Auteurs	Nature de la maladie	Nombre des hémocultures	
		Effectuées	Positives Macroscopiques
Arloing et Dufourt	Tuberculose pulmonaire	67	2
Bonnet et Legros	Tuberculose pulmonaire	70	4
Barrmann, Benevolenskij et Goldstein	Tuberculose pulmonaire	81	0
	Tuberculose infantile	15	0
Beck	Tuberculose pulmonaire	106	0
	Tuberculose oculaire		0
Benedetti et Galotti	Tuberculose pulmonaire	11	0
Bianchi	Tuberculose pulmonaire	25	0
Brock	Tuberculose oculaire		0
	Tuberculose cutanée	6	0
Bernhardt	Tuberculose cutanée	60	0
Boas	Tuberculose infantile		1
Boer	Tuberculose infantile	104	0
Courmont	Tuberculose pulmonaire	98	0
Corper et Damerow	Tuberculose pulmonaire	120	0
Cribbin	Tuberculose pulmonaire	17	0
Cerqua	Tuberculose oculaire		0
Dimtza et Gustcher	Tuberculose oculaire		0
Dobszay	Tuberculose infantile	19	0
Emslie	Tuberculose pulmonaire	34	0
Frederiksen	Tuberculose pulmonaire	65	28
Favia et Fausto	Tuberculose pulmonaire	30	0
Fetzer et Schmidt	Tuberculose pulmonaire	94	0
Fetzer	Tuberculose oculaire		0
Funk	Tuberculose cutanée	300	0
Gravilow et Fester	Tuberculose pulmonaire	52	3
Goebel	Tuberculose infantile	60	0
Gualdi	Tuberculose infantile	10	0
Van der Hoeden	Tuberculose pulmonaire	59	0
Horns	Tuberculose pulmonaire	7	0
H. H. et E. Kalbfleish	Tuberculose pulmonaire	115	1

Auteurs	Nature de la maladie	Nombre des hémocultures	
		Effectuées	Positives Macroscopiques
Kuster et Olbrich	Tuberculose pulmonaire	456	1
	Tuberculose oculaire	78	1
	Tuberculose cutanée	97	(2Paratub.)
Kelemen	Tuberculose pulmonaire	30	0
	Tuberculose oculaire		0
	Tuberculose cutanée	8	0
Knorr	Tuberculose pulmonaire	30	0
Kalbfleish	Tuberculose oculaire		0
	Tuberculose cutanée	6	0
	Tuberculose infantile	34	0
Liebermeister	Tuberculose pulmonaire	50	1
Laymon	Tuberculose pulmonaire	20	0
	Tuberculose oculaire		0
	Tuberculose cutanée	8	0
Legezinsky	Tuberculose oculaire		0
Legezinsky et Ostrowski..	Tuberculose cutanée	30	0
Laurinisch et Zambrano ..	Tuberculose infantile	105	0
Munster-Frank	Tuberculose pulmonaire	260	0
Pearce	Tuberculose pulmonaire	48	(3Paratub.)
Piccioli	Tuberculose pulmonaire	46	0
Pietroni et Buonomini ...	Tuberculose pulmonaire	100	0
Popoff et Rouseff	Tuberculose pulmonaire	2	0
	Tuberculose cutanée	28	0
Rosetti	Tuberculose pulmonaire	47	1
Rordorf	Tuberculose infantile	15	0
Schramek	Tuberculose pulmonaire	322	2
Stempel et Burki	Tuberculose pulmonaire	107	1
Szule	Tuberculose pulmonaire	98	4
Sergent, Durand, Gaspar et Marcoux	Tuberculose pulmonaire	19	0
Stadler	Tuberculose pulmonaire	60	0
Stocklin	Tuberculose pulmonaire	80	0
Ullmo	Tuberculose cutanée	15	0
Zoboli	Tuberculose pulmonaire	138	0
Zappia	Tuberculose infantile	20	0
53 auteurs		4.518	50
Pourcentage : 1,10 %			

*Hémocultures pratiquées chez des malades atteints
de polyarthrites rhumatismales*

Auteurs	Nature de la maladie	Nombre des hémocultures	
		Effectuées	Positives macroscopiques
Brock	Polyarthrite rhumat.	2	0
Favia et Fausto	Polyarthrite rhumat.	11	0
Gonzales Podesta et Nesi..	Polyarthrite rhumat.	34	0
Kalbfleisch	Polyarthrite rhumat.	13	0
Kuster et Olbrich	Polyarthrite rhumat.	111	(3 Parat.)
Lotze	Polyarthrite rhumat.	20	0
Paraf et Abaza	Polyarthrite rhumat.	22	0
Pearce	Polyarthrite rhumat.	3	0
Popper	Polyarthrite rhumat.	400	5
Pietroni et Buonomini ...	Polyarthrite rhumat.	10	0
Rosetti	Polyarthrite rhumat.	7	0
Singer	Polyarthrite rhumat.	86	0
Trosarelli	Polyarthrite rhumat.	28	0
		767	5

*Hémocultures pratiquées chez des malades
atteints de maladies mentales*

Auteurs	Nature de la maladie	Nombre des hémocultures	
		Effectuées	Positives macroscopiques
Ananiadès, Papanargyrou et Scouras	Démence précoce	14	0
Beck	Démence précoce	125	0
	Sclérose multiple	2	0
Brock	Sclérose multiple	1	0
Bruynoghe et Adant	Démence précoce	3	0
Kuster et Olbrich	Démence précoce	128	(1 Parat.)
	Autres maladies nerveuses	75	0
		348	0

EXPÉRIENCES DE CONTROLE EFFECTUÉES PAR LES EXPERTS NOMMÉS PAR LA SECTION D'HYGIÈNE DE LA SOCIÉTÉ DES NATIONS,

Nous en étions à ce point lorsqu'en août 1932, le P^r LOEWENSTEIN a attiré l'attention du Comité d'Hygiène de la S. D. N. sur ses recherches sur l'hémoculture du bacille de Koch. Pour permettre d'établir sans contestations possibles l'étiologie tuberculeuse de la démence précoce, ce savant proposa à la Section d'Hygiène du Secrétariat de la S. D. N. de demander aux Asiles d'aliénés de divers pays d'envoyer à son laboratoire de Vienne des échantillons de sang, prélevés chez des déments précoces, afin de les ensemer selon sa méthode. Etant donné la portée des affirmations du P^r LOEWENSTEIN, le D^r TH. MADSEN, Président du Comité d'Hygiène de la S. D. N., estima qu'il fallait, avant de s'engager plus loin, faire procéder en premier lieu à des examens de contrôle. Le P^r LOEWENSTEIN et le D^r MADSEN se sont mis d'accord pour que ces contrôles fussent organisés dans divers laboratoires spécialisés dans l'étude de la tuberculose, en vue de rechercher les causes de divergences existant entre les résultats fournis par le P^r LOEWENSTEIN, et ceux enregistrés par les divers expérimentateurs qui ont utilisé son procédé. Sur l'initiative du D^r MADSEN, les savants dont les noms suivent se déclarèrent prêts à collaborer à ces recherches de contrôle ;

P^r A. CALMETTE et D^r A. SAENZ, de l'Institut Pasteur de Paris.

P^r A. STANLEY GRIFFITH, de Cambridge.

Dr K. A. JENSEN, du Staten seruminstitut de Copenhague.

Pr W. KOLLE, du Staatliches Institut für experimentalle Therapie de Francfort-sur-le-Mein.

Pr UHLENHUTH et Dr SEIFFERT, de l'Institut d'Hygiène de Fribourg-en-Brigau.

En novembre 1932, le Pr LOEWENSTEIN autorisait le Dr JENSEN à faire un stage dans son laboratoire pour lui permettre de s'initier à tous les détails de la technique viennoise. En collaboration, ils ont établi un programme de recherches comparatives sur la culture du bacille tuberculeux à partir du sang, qui devait être étudiée particulièrement dans la démence précoce, les diverses formes de tuberculose, le rhumatisme, et d'autres affections articulaires. Ces recherches comparatives, dont la centralisation était confiée à l'Institut de Copenhague, ont été alors entreprises selon les plans conçus avec l'agrément de tous les experts et du Pr LOEWENSTEIN. Pour augmenter encore la précision des résultats, les Instituts de Copenhague, Francfort-sur-le-Mein, et Fribourg-en-Brigau ont divisé leurs prises de sang en un certain nombre de portions, qui ont été soumises à un examen comparatif dans les autres Instituts, et dont une partie a également été examinée par le Pr LUDWIG LANGE, du Reichsgesundheitsamt de Berlin.

Cependant, au cours de la réalisation de ce programme, des divergences troublantes n'ont pas tardé à apparaître entre les résultats obtenus par le Pr LOEWENSTEIN d'une part, et par le Dr JENSEN et le Pr GRIFFITH de l'autre. Dans ces conditions, il a été jugé nécessaire de porter ces divergences à la connaissance du Pr LOEWENSTEIN. Un échange de vue eut donc lieu le 22 octobre 1933 dans les laboratoires de la tuberculose à l'Institut Pasteur entre les Prs CALMETTE, GRIFFITH, LOEWENSTEIN, MADSEN, et le Dr SAENZ. Au cours de cette séance, le Pr CALMETTE a présenté, en son nom et en celui du Dr SAENZ, un rapport préliminaire que nous développerons plus loin, et à cette occasion le Pr LOEWENS-

TEIN a cherché à expliquer les discordances des résultats entre Paris et Vienne par les deux facteurs suivants : différence de consistance entre les milieux de culture employés et collaboration insuffisante de la clinique et du laboratoire. Quand nous commenterons le rapport du Pr CALMETTE et du Dr SAENZ sur cette question, nous répondrons à ces objections.

Nous commencerons notre exposé par les résultats des hémocultures effectuées en 1933 par A. SAENZ en collaboration avec nous-même, et qui ont été pratiquées d'après les indications formulées dans le programme de la S. D. N.

La seule modification importante introduite dans la technique précédemment décrite porte sur le traitement du culot de centrifugation à ensemercer. Voici en quoi elle consiste : 20 cm³ de sang ont été recueillis par ponction veineuse aseptique dans l'appareil « Haemaut », de 30 cm³ de capacité, contenant 2 cm³ d'une solution de citrate de soude à 10 p. 100. Après avoir pris les précautions nécessaires pour l'ouverture du col de cet appareil, on décante avec une pipette à boule le plasma surnageant, la sédimentation ayant été réalisée par un séjour de 24 heures en position verticale au laboratoire. Le sédiment d'hématies, fortement agité, est transvasé, au moyen d'une autre pipette à boule, dans un tube centrifugeur de 200 cm³ contenant 10 cm³ d'eau distillée. On rince l'Haemaut avec de l'eau distillée stérile, et avec ce produit de rinçage on achève de remplir le tube centrifugeur. On centrifuge pendant 20 minutes à 2.000 tours. On rejette le liquide et le culot est agité violemment à l'aide d'une baguette de verre stérile dans 200 cm³ d'eau distillée stérile. On centrifuge de nouveau, et le culot ainsi obtenu est traité par 2 cm³ d'acide sulfurique à 15 p. 100 pendant trois minutes. On complète alors avec de l'eau distillée stérile le contenu du tube, on agite de nouveau le culot et on centrifuge une troisième fois pendant 15 minutes. La même opération de lavage et de centrifugation est

répétée une quatrième fois. Alors l'hémoglobine se trouve complètement éliminée et le culot, qui a pris une coloration blanc-grisâtre, estensemencé comme précédemment sur 6 tubes du milieu de LOEWENSTEIN au vert-malachite.

Résultats de la deuxième série d'hémocultures effectuées jusqu'en octobre 1933. (époque à laquelle a été présenté le rapport préliminaire de A. CALMETTE et A. SAENZ).

Avec cette technique ces auteurs ont étudié :

1^o Le sang de 90 malades atteints de formes diverses de tuberculose pulmonaire avérée, dont la plupart avaient des crachats bacillifères. Ces échantillons de sang provenaient des services cliniques des P^r L. SAYÉ (de Barcelonne), LÉON BERNARD et du D^r AMEUILLE (de Paris).

2^o Le sang de 30 malades atteints de démence précoce, provenant des services du P^r LAIGNEL-LAVASTINE (Salpêtrière) et de M^{lle} Pascal (Asile de Maison Blanche à Neuilly-sur-Marne).

3^o Le sang de 14 sujets atteints de rhumatisme, du service du D^r COSTE à Paris.

Sur les 90 sangs du premier groupe, 50 ont pu être inoculés aux cobayes, et les animaux sont restés en observation pendant des laps de temps variant de 5 à 7 mois. Tous ont été éprouvés périodiquement par intradermo-tuberculination (1/10^e de cm³ de tuberculine diluée à 1/10^e). Voici les résultats :

Examen direct. — Jamais de bacilles acido-résistants dans les étalements de culot colorés au Ziehl-Neelsen. Une fois seulement sur 90, nous avons obtenu d'emblée le développement d'une culture macroscopique apparue le 20^e jour : on a compté 15 colonies sur un seul des 6 tubesensemencés. Dans la suite, les réactions biologiques et les inoculations aux cobayes et aux lapins ont montré qu'il s'agissait de bacilles de *type humain*. Cette culture positive provenait du sang d'un malade du service du P^r LÉON BER-

NARD, atteint d'une tuberculose pulmonaire fébrile, cavitaires et en pleine évolution. Ce malade a fait, quelques jours après la prise de sang, une poussée granulique.

Sur les 50 échantillons de sang de ce premier groupe, l'inoculation du culot de centrifugation au cobaye n'a fourni aucun résultat positif.

Il en a été de même pour les malades des 2^e et 3^e groupes. Sur les 30 démenes précoces nous n'avons obtenu ni développement de cultures, ni tuberculisation du cobaye.

Les 14 hémocultures de rhumatisants se sont montrées également négatives.

Si nous comparons ces résultats avec ceux de nos précédentes recherches, il apparaît qu'en employant, soit la technique primitive de LOEWENSTEIN, soit la seconde technique indiquée dans le programme technique du comité d'hygiène de la S. D. N., nous avons obtenu des pourcentages de cultures macroscopiquement visibles et virulentes d'emblée sensiblement identiques (1, 1 p. 100). Par contre, en substituant l'acide sulfurique à l'acide acétique pour l'hémolyse du sang, on supprime les pullulations de bacilles paratuberculeux saprophytes qui nous avaient si manifestement gênés dans nos premières recherches. En effet, les expériences que nous avons décrites précédemment nous ont montré que l'acide acétique, très toxique pour les bacilles tuberculeux des mammifères, l'est fort peu ou pas du tout pour les paratuberculeux saprophytes. Ces derniers ont résisté, comme nous l'avons vu, dans le liquide de Sauton à trois quarts d'heure de contact avec de l'acide à 10 p. 100.

Résultats de la troisième série d'hémocultures pratiquée en tenant compte des critiques faites par Loewenstein.

(Rapport de A. CALMETTE et A. SAENZ).

A la suite de la réunion d'experts qui s'est tenue en octobre 1933 à l'Institut Pasteur sous la Présidence de

A. CALMETTE, LOEWENSTEIN a essayé d'expliquer la discordance entre ces résultats et les siens par les deux causes suivantes :

1^o La consistance des milieux de culture employés à l'Institut Pasteur était plus ferme que celle des milieux préparés à Vienne, bien qu'ils continssent tous deux la même quantité d'eau de condensation.

2^o On n'avait pas travaillé en collaboration suffisamment intime avec des cliniciens avertis.

Pour répondre à ces objections, nous avons, en premier lieu, et sous la direction de M. LOEWENSTEIN, changé le système de coagulation des milieux pour adopter celui à la vapeur courante employé à Vienne. De plus, le culot de chaque échantillon de sang a été ensemencé, dans la plupart des cas, en parties égales sur des tubes envoyés de Vienne par LOEWENSTEIN et sur ceux préparés à l'Institut Pasteur.

En second lieu, nous avons établi une collaboration étroite avec des cliniciens éminents et spécialisés, qui ont soigneusement posé les diagnostics cliniques de tuberculose (P^r LÉON BERNARD, SAYÉ, AMEUILLE, etc...), de démence précoce (C. PASCAL, de l'Asile de Maison-Blanche) et de rhumatisme (F. COSTE).

En procédant ainsi, ces auteurs ont étudié :

1^o Le sang de 166 sujets atteints de formes diverses de tuberculose pulmonaire, rénale, osseuse ou cutanée. Pour 71 de ces cas, le culot d'ensemencement a été cultivé et inoculé simultanément, par voie sous-cutanée, à deux cobayes. Le reste, soit 95 cas, a été ensemencé sur 6 tubes, 3 du milieu envoyé par LOEWENSTEIN et 3 de celui préparé dans notre laboratoire. Après une période d'observation de trois mois, on n'a obtenu au total que deux résultats positifs. Dans un cas, 5 colonies ont apparu 24 jours après l'ensemencement sur un seul des tubes. Les caractères morphologiques de la culture, ainsi que sa virulence pour les ani-

maux, ont permis de constater qu'il s'agissait d'une souche du type humain. Le sang provenait d'une malade qui présentait une tuberculose pulmonaire grave, bilatérale, ulcéreuse, évolutive, d'après les renseignements donnés par le Pr. SAYÉ. La deuxième culture positive avait également été isolée d'une tuberculeuse pulmonaire et osseuse du service du Pr. SAYÉ : l'inoculation et l'ensemencement du sang ont permis d'obtenir une souche de bacilles des mammifères, virulente pour le cobaye.

2^o 113 cas de démence précoce, parmi lesquels nous avons pratiqué dans 53 cas l'hémoculture et dans 60 la culture du liquide céphalo-rachidien et l'inoculation simultanée au cobaye.

Sur les 53 hémocultures étudiées, nous n'avons en aucun cas pu déceler de bacilles acido-résistants ni par l'ensemencement, ni sur les frottis du culot de sang colorés par la méthode de Ziehl-Neelsen. Les milieuxensemencés avec les 60 liquides céphalo-rachidiens n'ont jamais donné de cultures macroscopiques ; de même, les cobayes inoculés sont demeurés indemnes de toute lésion suspecte de tuberculose après trois mois d'observation.

3^o Enfin, le sang provenant de 23 sujets atteints de formes diverses de rhumatisme aigu ou chronique. Dans ce groupe, bien que plusieurs de ces malades présentassent des signes évidents de tuberculose, et que la plupart fussent fortement allergiques, les ensemencements ainsi que les inoculations sont restés négatifs.

Maintenant que nous avons donné les résultats des recherches, que nous avons poursuivies durant trois ans, il nous est facile de comparer les chiffres de nos trois séries d'hémocultures, et de nous rendre compte de ce que peut pratiquement donner la méthode de LOEWENSTEIN pour mettre en évidence la bacillémie tuberculeuse. Dans ce tableau d'ensemble, nous ne ferons pas état des cas où la présence des bacilles acido-résistants a été constatée par le

seul raclage des tubes, puisque nous sommes fixés, à l'heure actuelle, sur la valeur et la signification de ces soi-disant microcultures non repiquables.

Nombre total d'hémocultures pratiquées in vivo : 936.

Nombre total des tubesensemencés : 5676.

	Nombre de cas	Résultats positifs	Pour- centage
A) <i>Première série.</i>			
Formes diverses de tuberculose et rhumatis- me	500	9	1,8 %
B) <i>Deuxième série.</i>			
Tuberculose pulmonaire cutanée ou osseuse avérée	90	1	1,1 %
Démence précoce	30	0	
Rhumatisme aigu ou chronique	14	0	
C) <i>Troisième série.</i>			
Tuberculose pulmonaire, osseuse ou cutanée assez avancée	166	2	1,2 %
Démence précoce, sang	53	0	
Démence précoce, liquide céphalo-rachidien ..	60	0	
Rhumatisme aigu ou chronique	23	0	
Total	936	12	1,2 %

La lecture de ce tableau fait apparaître un total de 12 résultats positifs sur 936 échantillons de sang examinés, soit 1,2 %. Il permet également de constater que toutes les hémocultures de déments précoces et de rhumatisants sont restées négatives.

Avant de discuter ces résultats, qu'il nous soit permis d'exposer encore la nouvelle série de recherches que A. SAENZ a entreprise, en collaboration avec nous-même, afin de nous rendre compte si notre échec pouvait s'expliquer par quelque erreur de technique qui aurait pu se glisser par inadvertance dans nos expériences. Dans ce but, d'accord avec

l'auteur de la méthode, nous nous sommes rendu à Vienne où nous avons travaillé pendant une semaine dans le laboratoire du P^r LOEWENSTEIN. Pendant notre stage, nous avons eu l'occasion d'appliquer la technique de LOEWENSTEIN à 32 échantillons de sang selon le plan d'expérience suivant :

Chaque sédiment traité étaitensemencé à la surface de 4 à 6 tubes de milieu provenant, en parties égales, du laboratoire de Vienne et de l'Institut Pasteur. Une partie de ces tubes est restée en observation dans le laboratoire du P^r LOEWENSTEIN, et l'autre a été rapportée par nous-mêmes à l'Institut Pasteur.

Les 32 examens effectués comprenaient :

1^o 24 échantillons de sang qui avaient été envoyés au P^r LOEWENSTEIN.

2^o 8 échantillons de sang qui provenaient de l'Institut Pasteur.

Voici les résultats fournis par ces hémocultures, et tirés uniquement de la lecture des tubes suivis dans notre laboratoire à l'Institut Pasteur.

Hémocultures pratiquées par L. Costil dans les laboratoires du Pr. Loewenstein à Vienne

Sang N ^o	Service	Date de l'ensemencement	Examen direct du culot	Résultats. Nombre de colonies 30 jours après l'ensemencement	
				Tubes de l'Institut Pasteur	Tubes de Loewenstein
Première série concernant les échantillons fournis par M. Loewenstein					
18.203	Pr. Falla	3-5-34	—	0	0
18.204	Pr. Loewenstein	3-5-34	+++	16	nombreuses
18.205	Pr. Neumann	3-5-34	—	0	0
18.206	»	3-5-34	+++	2	nombreuses
18.207	»	3-5-34	—	0	0
18.208	»	3-5-34	—	0	0
18.209	»	3-5-34	—	0	0
18.210	»	3-5-34	—	0	0
18.211	»	3-5-34	—	0	0
18.214	Pr. Reiter	3-5-34	—	0	0
18.216	Pr. Neumann	4-5-34	—	0	0
18.217	»	4-5-34	—	0	0
18.218	Pr. Vilardell	4-5-34	—	0	0
18.219	Pr. Berger	4-5-34	—	0	0
18.220	»	4-5-34	—	0	0
18.221	»	4-5-34	—	0	0
18.222	»	4-5-34	—	0	0
18.223	»	4-5-34	—	0	0
18.224	»	4-5-34	—	0	0
18.225	»	4-5-34	—	0	0
18.226	»	4-5-34	—	0	0
18.227	»	4-5-34	—	0	0
18.228	Pr. Meller	4-5-34	—	nombreuses	infectés
18.229	»	4-5-34	—	nombreuses	0
Deuxième série concernant les échantillons apportés de l'Institut Pasteur					
18.233	Institut Pasteur	4-5-34	—	0	0
18.234	»	4-5-34	—	nombreuses	0
18.235	»	4-5-34	—	16	0
18.236	»	4-5-34	—	0	0
18.237	»	4-5-34	—	0	0
18.238	»	4-5-34	—	nombreuses	quelques colonies
18.239	»	4-5-34	—	0	0
18.240	»	4-5-34	—	3	4
N ^o 18.233, 18.236, 18.237, 18.239 : Sangs de lapins neufs.					
N ^o 18.234 : Sang de lapins avec 1/10.000 de mgr. de bacilles humains.					
N ^o 18.235 : » » » » 1/1.000 de mgr. de bacilles BCG.					
N ^o 18.238 : » » » » 1/1.000 de mgr. » » humains.					
N ^o 18.240 : » » » » 1/1.000 de mgr. » » bovins.					

Nous observons que parmi les 24 ensemencements du premier groupe, 20 ont donné des résultats négatifs, tant dans les tubes de Vienne que dans ceux de l'Institut Pasteur. Pour les quatre autres sangs, nous avons enregistré 4 cultures positives ; on avait déjà constaté dans le culot d'ensemencement, à l'examen direct de deux de ces sangs, d'énormes amas de bacilles acido-résistants.

Ces deux cultures provenaient de malades atteints, l'un (W. R.), n° 18.204, d'une polyarthrite aiguë, l'autre (B. H.) n° 18.206, d'un érythème induré de Bazin. Les colonies, très nombreuses dans tous les tubes originaires du laboratoire de LOEWENSTEIN, sont apparues après 20 jours ; dans ceux préparés à l'Institut Pasteur, on a relevé, dans un cas, 16 colonies, et dans l'autre, deux colonies. Disons de suite que cette différence s'explique aisément du fait que les premiers ont reçu 10 fois plus de semence que les derniers.

Les deux autres cas positifs, concernant deux malades, P. L. (n° 18.228) et S. A. (n° 18.229), atteints d'ophtalmie sympathique, ont donné de très nombreuses colonies dans les tubes fournis par l'Institut Pasteur ; ceux de Vienne se sont trouvés soit desséchés, soit infectés secondairement, et ce sont peut-être ces circonstances qui ont empêché le développement du bacille de Koch.

Les réactions biologiques et l'inoculation au cobaye nous ont permis d'établir qu'il s'agissait, pour les quatre souches, de bacilles tuberculeux des mammifères.

En ce qui concerne les 8 échantillons du 2^e groupe, 4 qui étaient du sang de lapin neuf, servaient de témoins et sont demeurés stériles dans les tubes des deux origines. Les 4 restants, qui étaient des sangs de lapins neufs inoculés avec $1/1.000^e$ ou $1/10.000^e$ de mgr. de bacilles d'origine humaine, bovine ou de B C G., ont tous donné des résultats positifs dans les tubes préparés à Paris. Le nombre de colonies obtenues, sauf pour le B C G. a été en relation avec la

quantité de semence. Par contre, deux fois, ces échantillons, ensemencés dans les tubes du laboratoire du Pr. LOEWENSTEIN, n'ont donné lieu à aucun développement bacillaire.

Ce tableau fait ressortir nettement les trois faits suivants :

1^o Présence de bacilles de Koch chez 16 % des malades atteints d'affections diverses, décelés par hémoculture, dans le laboratoire du Pr. LOEWENSTEIN.

2^o Présence, dans le culot d'ensemencement du sang de sujets atteints d'érythème induré de Bazin et de polyarthrite aiguë, de grandes quantités de bacilles mis en évidence par l'examen direct des frottis.

3^o En ce qui concerne les milieux de culture, les tubes de l'Institut Pasteur se sont révélés au moins aussi sensibles que ceux fournis par l'auteur viennois.

DISCUSSION

(Rapport de A. CALMETTE et A. SAENZ)

Voici comment s'expriment à ce sujet ces auteurs :

« Arrivés au terme de notre travail, nous sommes maintenant en mesure de nous demander si nos résultats négatifs peuvent s'expliquer par l'analyse de tous les facteurs qui sont intervenus au cours de nos recherches. »

« En premier lieu, il n'est pas vraisemblable que des écarts de technique puissent être la cause de nos échecs. Depuis quatre ans nous sommes familiarisés avec cette méthode, et la régularité de nos résultats expérimentaux nous autorise à croire que nous la possédons dans ses moindres détails. »

« D'autre part, ce facteur ne doit pas jouer un rôle fondamental, puisque les modifications successives que M. LOEWENSTEIN a introduites en deux ans dans les diverses phases du traitement du culot à ensemencer, ne l'ont pas empêché d'obtenir toujours un fort pourcentage d'hémocultures positives, aussi bien dans la tuberculose que dans la démence

précoce, le rhumatisme et certaines autres maladies d'origine nerveuse ou à étiologie obscure comme l'érythème induré de Bazin. »

« Du reste, si des erreurs de technique ont pu se glisser dans notre façon d'appliquer la méthode, elles ne sont pas décelables, car LOEWENSTEIN qui, à deux reprises, nous a vu effectuer des hémocultures dans notre laboratoire, s'est porté garant de la correction avec laquelle nos collaborateurs et nous-mêmes appliquions sa technique. »

« D'ailleurs, nous ferons remarquer que déjà en 1930, l'un de nous, à peine initié aux détails de l'hémoculture, obtenait dans le laboratoire du Pr. LOEWENSTEIN d'abondantes cultures que nous n'avons pas réussi à obtenir par la suite à l'Institut Pasteur. De même, il a suffi à notre collaborateur L. COSTIL, — qui, pendant de long mois, a échoué, à Paris, dans plus de 100 ensemencements de sang provenant de tuberculeux sélectionnés et d'autres malades — d'appliquer à Vienne une technique identique pour avoir en quelques jours dans un groupe de maladies hétérogènes, un fort pourcentage de résultats positifs (16 %). »

« Enfin, la question de technique n'intervient pas dans le fait que LOEWENSTEIN trouve assez fréquemment, à l'examen direct, des bacilles en nombre considérable, dans le culot de sang ou de liquide céphalo-rachidien de sujets atteints de démence précoce, de rhumatisme, de chorée ou d'érythème induré de Bazin. Quant à nous, nous n'avons jamais pu faire de pareilles constatations dans des centaines de frottis que nous avons examinés. »

« En second lieu, envisageons si le milieu de culture que nous avons utilisé peut être rendu responsable de la divergence des résultats obtenus. »

« A cet effet, nous avons fait de nombreux ensemencements, en employant pour cette étude comparative des tubes de culture de Vienne et de Paris en nombre égal. Ces tubes ont été ensemencés soit avec des émulsions ba-

cillaires, soit avec des échantillons de sang artificiellement infectés, soit enfin avec le sang de cobayes et de lapins tuberculeux. Ces expériences ont permis de constater, en ce qui concerne leur sensibilité respective, la parfaite similitude des deux milieux. Nos ensemencements ont été fertiles indifféremment dans les tubes de Paris et de Vienne, chaque fois que le produit examiné contenait pour le moins 20 bacilles par cm^3 .

« D'autre part, quand il s'agit d'appliquer la technique de LOEWENSTEIN au sang du cœur de sujets morts de tuberculose évolutive, nos résultats positifs très élevés (40 %) concordent parfaitement avec les recherches du Pr. LOEWENSTEIN sur les cadavres. D'ailleurs, c'est exclusivement dans ces cas que nous avons obtenu le développement de nombreuses colonies sur la totalité des tubes ensemencés avec chaque échantillon. »

« De plus, nous avons vu dans la première série des hémocultures effectuées par notre collaborateur L. COSTIL à Vienne (voir tableau page 162) que si notre milieu de culture s'est révélé identique à celui du Pr. LOEWENSTEIN, par contre, il s'est montré, dans la deuxième série, beaucoup plus sensible, puisque les tubes de l'Institut Pasteur ont donné 4 résultats positifs sur 8 ensemencements, alors que ceux de Vienne n'en ont fourni que deux. »

« La différence de sensibilité du milieu ne peut pas, non plus, être invoquée pour expliquer notre échec complet dans la culture de 60 liquides céphalo-rachidiens de déments précoces, pour la simple raison que la moitié de ces ensemencements était effectuée dans des tubes originaux de Vienne ; ici, non plus, la technique ne joue aucun rôle. Or, le Pr. LOEWENSTEIN obtient assez fréquemment, dans les mêmes conditions et dans les mêmes milieux, des résultats positifs et par l'examen direct et par la culture ; celle-ci est si luxuriante, qu'elle semble indiquer une richesse bacillaire comparable à celle observée parfois dans les crachats bacillifères. »

« Il nous reste à analyser l'objection concernant la collaboration qui doit exister entre les cliniciens et les biologistes pour déterminer le moment le plus probable du passage du bacille de Koch dans le sang, condition indispensable pour la réussite des hémocultures. On a vu que, dans la troisième série d'hémocultures, nous avons mis un soin particulier à obtenir cette collaboration de la clinique et du laboratoire, mais le pourcentage de résultats positifs (sur 290 cas étudiés dans cette série) a été sensiblement identique (1,2 %) à ceux obtenus précédemment. »

« D'un autre côté, les mêmes échantillons de sang envoyés par le Pr. SAYÉ, de Barcelone, à nous-même et au Pr. LOEWENSTEIN, ont donné plusieurs fois des résultats positifs dans le laboratoire de Vienne, tandis qu'ils ont toujours été négatifs à l'Institut Pasteur. »

« Le même fait s'est produit en octobre dernier, chez 12 tuberculeux granuliques choisis par le Pr. LÉON BERNARD ; bien que l'hémoculture ait été pratiquée dans notre laboratoire, sous la direction même du Pr. LOEWENSTEIN, et que lesensemencements aient été effectués dans les tubes qu'il avait apportés, pas une seule culture n'a pu être isolée. »

« Étant donné que LOEWENSTEIN trouve un pourcentage si élevé d'hémocultures positives dans les maladies que nous avons étudiées, il est difficile de concevoir que le moment propice à la prise de sang ne puisse être établi que par les cliniciens de Vienne et non par ceux de Paris ou d'ailleurs. »

« Il y a même un contraste frappant entre nos résultats positifs et ceux de LOEWENSTEIN. Parmi les 12 souches isolées des 936 sangs que nous avons examinés, jamais la culture n'a été positive dans les six tubesensemencés avec chaque sang ; dans la plupart des cas, nous avons noté un développement de bacilles sur un seul tube et deux fois sur deux tubes. Les colonies ont toujours été peu nombreuses : 5, 8, 25 colonies au maximum. Or, LOEWENSTEIN, dans ses résultats positifs, obtient des cultures dans tous les tubes,

et le chiffre des colonies est presque toujours innombrable. »
« De plus, on remarque que ces hémocultures ont été obtenues en partant de maladies aussi différentes que la tuberculose, la démence précoce et le rhumatisme. »

« A première vue, on pouvait se demander s'il s'agissait bien de cultures de bacilles tuberculeux des mammifères. Or, nous avons identifié 12 souches qui nous avaient été apportées en octobre dernier par le Pr. LOEWENSTEIN lui-même, et qui provenaient de sujets atteints des mêmes maladies, et nous pouvons affirmer qu'elles étaient bien virulentes, la plupart appartenant au type humain.

« Un mot, pour finir, en ce qui concerne les résultats positifs par l'examen direct, qui montre une abondance de germes parfois, si considérable que dans le même champ microscopique on trouve plusieurs amas comptant chacun des milliers de bacilles ; leur étude a permis de les classer parmi les souches d'origine humaine. On ne peut concevoir comment de tels amas de bacilles virulents peuvent ainsi circuler librement dans le torrent sanguin sans produire d'embolies microbiennes. »

CONCLUSIONS

(Rapport de A. CALMETTE et A. SAENZ)

1^o Des recherches variées et très nombreuses nous permettent d'affirmer qu'incontestablement le milieu de culture dont la composition a été établie par LOEWENSTEIN, se révèle supérieur à tous les milieux proposés jusqu'à présent pour la culture des bacilles tuberculeux d'origine humaine, bovine ou aviaire.

2^o Sur 936 échantillons de sangensemencés sur ce milieu, ce qui représente environ 6.000 tubes, en suivant exactement les prescriptions de LOEWENSTEIN, on n'a obtenu au

total que 12 résultats positifs, soit 1,2 %. Ces sangs appartenaient à des malades atteints de formes diverses de tuberculose aiguë ou chronique, à des rhumatisants et à des déments précoces.

3° Si on ne fait état que des hémocultures pratiquées chez les tuberculeux, les résultats positifs atteignent un pourcentage de 1,58 %. Le faible nombre de colonies obtenues dans chaque cas a démontré qu'il s'agissait d'une migration paucibacillaire. Presque toujours la souche isolée était de type humain.

4° Les cultures de 37 sangs de rhumatisants aigus ou chroniques et de 83 sangs et 60 liquides céphalo-rachidiens de malades atteints de démence précoce, sont restées négatives.

5° L'écart considérable entre notre pourcentage de résultats positifs chez les tuberculeux et celui de LOEWENSTEIN, ainsi que notre échec complet chez les rhumatisants et chez les déments précoces, ne peut être expliqué ni par des erreurs de technique, ni par des différences de sensibilité des milieux de culture, ni enfin par l'insuffisance de la collaboration entre la clinique et le laboratoire.

6° L'aspect luxuriant des cultures obtenues dans le laboratoire de LOEWENSTEIN, ainsi que les résultats positifs constatés à l'examen direct du culot d'ensemencement dans la démence précoce, l'érythème induré de Bazin et la polyarthrite, n'ont jamais été trouvés ni par nous ni par les autres laboratoires, malgré les efforts combinés d'un nombre considérable de chercheurs qualifiés.

En groupant par maladies les examens de sang ou de L. C. R. effectués par les différents auteurs qui sont intervenus dans les recherches de contrôle de la méthode de LOEWENSTEIN, on arrive à établir le tableau suivant :

	Calmette et Saenz		Kolle et Kuster		Jensen		Seiffert		Griffith		Totaux	
	Cas	+	Cas	+	Cas	+	Cas	+	Cas	+	Cas	+
Tuberculoses diverses	756	12	631	5	309	0	277	17	8	0	1.981	34
Démence précoce (sang)	83	0	128	1	43	0	22	1			276	2
Démence précoce (L. C. R.)	60	0									60	0
Sclérose en plaques .			15	0							15	0
Rhumatisme et Ery- thème noueux ...	37	0	111	1	83	0	4	0			235	1
Autres affections....			68	0	44	0	40	2			152	2
	936	12	953	7	479	0	343	20	8	0	2.719	39

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

De l'avis unanime des expérimentateurs qui ont participé aux recherches de contrôle, les faits signalés dans leur rapport conduisent aux conclusions suivantes :

1^o L'hémoculture, pratiquée selon la technique de LOEWENSTEIN avec des échantillons de sang appartenant à des tuberculeux avérés, n'a pas donné le pourcentage élevé de résultats positifs indiqué par LOEWENSTEIN.

2^o LOEWENSTEIN a obtenu un pourcentage de résultats positifs qui dépasse, il est vrai, celui des experts ; cependant, il est loin d'atteindre les chiffres indiqués dans ses travaux antérieurs.

3^o L'ensemencement selon la technique de LOEWENSTEIN des échantillons de sang prélevés sur des sujets atteints de démence précoce n'a donné, à deux exceptions près, que des résultats négatifs. Dans des échantillons de sang provenant de sujets atteints de rhumatisme ou d'érythème noueux le bacille de Koch n'a pu, sauf dans un cas, être mis en évidence.

4^o Les divergences entre les résultats de LOEWENSTEIN et ceux des expérimentateurs ne sont pas imputables à des défauts de technique de la part de ces derniers, pas plus qu'à des erreurs posées dans le diagnostic chez les donneurs de sang.

CARACTÈRES ET INTERPRÉTATIONS DES CAS CLINIQUES QUI ONT FOURNI UN RÉSULTAT POSITIF

Déjà en 1933, A. SAENZ, cherchant à se rendre compte de la signification que pouvait avoir la bacillémie en clinique humaine, a fait pour chaque hémoculture positive, une enquête auprès du clinicien qui lui avait fourni l'échantillon de sang.

D'après les renseignements qui lui ont été communiqués, il a pu classer ces résultats positifs en quatre catégories, en faisant abstraction d'un cas où un bacille aviaire a été isolé (1).

Disons d'abord que la plupart des résultats obtenus correspondent à des primo-infections de l'enfant et de l'adolescent. Ensuite viennent les cas relatifs à des tuberculoses aiguës en pleine évolution et à issue fatale. Après cela, nous avons obtenu des résultats positifs dans des formes diverses de tuberculose chronique dont l'hémoculture positive correspondait à une nouvelle localisation ou à une poussée évolutive de la maladie.

En dernier lieu, les résultats positifs les moins favorables

(1) Nous ferons simplement remarquer, sans en tirer aucune conclusion, que pour notre cas d'hémoculture positive à bacille aviaire (Malade J...), le professeur Sayé nous a communiqué le diagnostic clinique de tuberculose ostéo-tarsienne articulaire en période fébrile. Or, en inoculant un cobaye par voie sous-cutanée dans l'aîne avec un bacille aviaire, nous avons pu reproduire chez cet animal des ostéo-arthrites à marche torpide, desquelles nous avons isolé, deux ans après l'inoculation, le bacille aviaire en culture pure. Il est frappant de constater que chez deux espèces considérées comme peu réceptives ou réfractaires au bacille aviaire, on puisse trouver ce germe dans des processus anatomo-pathologiques analogues.

provenaient de malades atteints de formes diverses de tuberculose chronique.

Ces résultats sont en complet accord avec ceux que nous avons obtenus en ensemençant le sang du cœur de sujets après la mort. Nous avons eu (A. SAENZ, J. de MIGUEL, et L. COSTIL) 7 résultats positifs sur 13 échantillons de sang provenant de cas aigus de tuberculose évolutive, alors que nous n'avons noté qu'un seul succès sur 20 échantillons de sang provenant de malades morts de formes diverses de tuberculose chronique. Ces constatations concordent avec celles de Abt, LONG, RABINOWITSCH, et surtout avec celles de POPPER, BODART et SCHINDLER, qui ont réussi à déceler 18 fois le bacille de Koch en cultivant le sang du cœur de 24 sujets morts de tuberculose progressive mortelle, tandis que l'ensemencement du sang du cœur provenant de 64 malades qui avaient succombé en présentant des formes diverses de tuberculose chronique non évolutive n'a donné qu'un résultat positif.

Les faits qui précèdent montrent que la bacillémie en clinique humaine présente les mêmes caractères que dans la tuberculose expérimentale, où la dissémination bacillaire est précoce, c'est-à-dire qu'elle se produit avant l'apparition de l'allergie et de tout autre signe de tuberculose décelable par les différents examens cliniques. En outre, dans les deux cas, elle est toujours paucibacillaire et fugace.

C'est, d'ailleurs, en s'inspirant de ces faits et de nos recherches sur l'hémoculture chez le chimpanzé (bacillémie initiale après absorption de B C G) que A. CALMETTE, B. WEILL-HALLE, A. SAENZ et nous-même, avons réussi à démontrer l'absorption du bacille B C G chez le nouveau-né vacciné. Il nous a été possible de déceler la présence de ces bacilles-vaccins par hémoculture 4 à 6 heures après l'ingestion.

Ces expériences ont été réalisées dans les conditions suivantes : 43 nourrissons non allergiques à la tuberculine,

reçoivent, par voie buccale, une dose unique de B C G, variant entre 3 à 4 centigrammes.

A ces enfants on a prélevé, 3 à 5 heures après l'ingestion du B C G, 5 à 8 cm³ de sang par ponction de la jugulaire. Ce sang a été rendu incoagulable par mélange immédiat avec 2 cm³ d'une solution stérile de citrate de soude à 10 p. 100. Après décantation du plasma, on a pris, de chaque échantillon, 2 cm³ du dépôt de leucocytes et d'hématies, qu'on a hémolysés dans un volume égal d'eau distillée. 3 cm³ de ce mélange ont été répartis entre 6 tubes de milieu de LOEWENSTEIN à raison de 0 cm³, 5 par tube. Le reste de chaque prise, traité par l'acide sulfurique à 10 p. 100, fut, après centrifugation et lavage du culot, ensemencé dans les mêmes conditions.

Sur les 43 échantillons de sang, nous avons obtenu six résultats positifs, et, chaque fois, l'identification des colonies a montré qu'elles étaient constituées par du B C G pur.

Ces colonies, en général très rares pour chaque échantillon (3 en moyenne sur 6 tubes ensemencés), sont devenues macroscopiquement visibles dix à douze jours après l'ensemencement pour tous les cas positifs. Cette précocité de l'apparition des colonies démontre, comme on devait s'y attendre, qu'il s'agit, non de bacilles qui se seraient déjà multipliés dans le sang, mais de bacilles provenant du vaccin ; dans ces conditions, l'hémoculture est comparable à un réensemencement direct d'une culture de B C G.

Une expérience semblable a été faite sur deux chimpanzés récemment arrivés à notre laboratoire, et qui ont ingéré en une seule dose 1 gramme de B C G. Quatre heures après, on a fait à chacun d'eux une prise de sang, et l'ensemencement de celui-ci fut positif pour l'un et pour l'autre.

Ces faits démontrent que l'absorption des bacilles-vaccins s'effectue très rapidement par la muqueuse intestinale, puisque ces bacilles peuvent être mis en évidence, comme

dans la tuberculose expérimentale, par l'hémoculture dans le sang circulant entre trois et cinq heures après l'ingestion unique.

Pour l'un de nos nourrissons, dont l'hémoculture avait été positive cinq heures après l'ingestion du vaccin, une seconde prise de sang, effectuée dix jours plus tard, donna une hémoculture négative.

La démonstration expérimentale de cette dispersion bacillaire, qui avait déjà été signalée après absorption du B C G par LÉON BERNARD, ROBERT DEBRÉ et MARCEL LELONG, survient très rapidement après l'arrivée des bacilles-vaccins dans le tube digestif et n'a qu'une courte durée (de même dans l'expérimentation). Peu d'heures après, les bacilles sont fixés dans les organes lymphatiques, où ils se cultivent et où ils déterminent ces légers engorgements ganglionnaires (micro-polyadénie), qui apparaissent et persistent souvent pendant quelques jours ou quelques semaines chez les enfants vaccinés.

Comme le prouve le cas étudié par ROBERT DEBRÉ, A. SAENZ et ROBERT BROCA, ces recherches montrent que rien ne s'oppose à ce que, par analogie avec la primo-infection du nourrisson, l'hémoculture puisse être positive dans la période anté-allergique.

D'après ces données, et faisant état des constatations expérimentales, ROBERT DEBRÉ, A. SAENZ et ROBERT BROCA, se sont adressés à l'enfant au moment de l'éclosion de la tuberculose pour rechercher la bacillémie et interpréter ses caractères. Chez 14 enfants ou nourrissons atteints de tuberculose initiale, ils ont réussi dans 6 cas (1 par hémoculture, 5 par inoculation au cobaye) à déceler un bacille de type humain, dans leur sang.

Ces bacillémies ont été révélées dans les circonstances suivantes : quatre cas de spléno-pneumonie tuberculeuse, témoignage d'une lésion initiale, un cas de fièvre bacillaire initiale (typho-bacillose) sans lésion pulmonaire constatée,

et un cas concernant un nourrisson hypotrophique présentant une lésion pneumo-ganglionnaire. Comme dans les hémocultures positives obtenues par A. SAENZ, la migration bacillaire a été pauvre, révélée par l'apparition de quelques colonies dans un seul tube sur les sixensemencés.

Le travail de Robert DEBRÉ, A. SAENZ et Robert BROCA met en relief la notion de cette migration bacillaire au début de la tuberculose de l'enfance, pendant que se constitue chez lui la lésion tuberculeuse initiale et que vire la réaction tuberculinique. Cette dispersion de quelques germes dans le sang circulant n'a aucune signification pour le pronostic : elle est bien loin de laisser prévoir une localisation métastatique, et moins encore une évolution fâcheuse de la tuberculose.

Tout dernièrement encore, ces faits ont été confirmés par Robert DEBRÉ et M. PERRAULT, qui ont étudié la dispersion du bacille de Koch par l'examen bactériologique et histologique des organes prélevés *post mortem* :

a) Chez 6 tuberculeux adultes atteints de tuberculose pulmonaire évolutive commune.

b) Chez 7 nourrissons à réactions tuberculiniques positives présentant des lésions initiales de tuberculose. Leurs conclusions sont identiques aux précédentes : chez les tuberculeux pulmonaires adultes, la bacillémie tuberculeuse est exceptionnelle, alors que dans la primo-infection de l'enfance les migrations bacillaires sont assez fréquentes, mais elles restent fugaces, et de faible importance numérique ; les rares bacilles entraînés vers les organes y sont sans doute assez promptement détruits.

Pour les cas révélés par l'inoculation au cobaye, elle a été traduite par une forme de tuberculose évolutive spéciale, qui avait déjà été observée par Robert DEBRÉ et BONNET, mais qui a été décrite par A. SAENZ, F. COSTE, et nous-même.

Les caractères de cette forme de tuberculose sont les sui-

vants : absence de chancre au point d'inoculation, et d'adénite inguinale ou lombaire correspondante, longue durée de la période anté-allergique, évolution extrêmement durable de la maladie (5 à 6 mois) avec tuberculisation progressive et très lente du foie, de la rate et des poumons, si on laisse l'animal vivre un temps suffisant.

Dans les recherches expérimentales sur l'infection paucibacillaire du cobaye, A. SAENZ et nous-même avons trouvé l'explication de cette forme spéciale d'évolution de la tuberculose. Quand on inocule à des lots de cobayes des doses décroissantes d'émulsions bacillaires virulentes (0,000,001 milligramme à 0,000,000,1 milligramme : moins de 20 bacilles), et qu'on éprouve périodiquement les animaux par intradermo-tuberculination, on constate que la période anté-allergique peut atteindre 5 à 6 mois. Parfois, les animaux ne présentent dans la suite, aucune lésion locale (3 cobayes sur 10) et on trouve à leur autopsie des lésions à prédominances pulmonaires tout à fait semblables à celles que nous allons décrire dans les exemples suivants :

Parmi plusieurs autres, deux cas sont particulièrement intéressants, ils concernent des cobayes inoculés avec le sang de deux rhumatisants.

20 cm³ de sang citraté du premier malade (M. R.), atteint de rhumatisme chronique d'allure tuberculeuse, sont inoculés le 29 décembre 1931 à 3 cobayes par voie sous-cutanée. Deux de ces cobayes, ayant reçu 5 cm³ chacun, sont morts de maladie intercurrente, l'un après 5 jours et l'autre après 18 jours. Le troisième, inoculé avec 10 cm³ de sang, fut éprouvé périodiquement par intradermo-tuberculination, il commença à réagir 5 mois après l'inoculation ; la réaction devint nécrotique au cours du septième mois. Sur l'animal, sacrifié à cette date (28 juillet 1932), voici nos constatations d'autopsie : absence de chancre et d'abcès au point d'inoculation, ganglions inguinaux et sous-lombaires normaux. Ganglions trachéo-bronchiques très hypertrophiés

(pois chiche) et caséeux ; lésions de broncho-pneumonie tuberculeuse discrète, bilatérale, contenant des bacilles acido-résistants ; rate légèrement hypertrophiée, sur laquelle on voit deux nodules contenant également des bacilles acido-résistants. Ces organes, inoculés au cobaye, l'ont tué en 60 jours avec chancre d'inoculation et signes classiques de tuberculose évolutive.

Le deuxième cas concerne un malade âgé de 63 ans (M. B.) bronchitique et rhumatisant chronique. Lors d'un accès de fièvre (39°) on prélève 20 cm³ de sang, qu'on inocule à dose égale à deux cobayes par voie sous-cutanée. Un de ces cobayes est mort de pneumococcie 5 mois après l'inoculation. Eprouvé périodiquement à la tuberculine, il n'a jamais réagi. Le deuxième cobaye commença à réagir à l'intradermo-tuberculation après 6 mois. La réaction devint nécrotique, le septième mois, et l'animal fut sacrifié le 20 juillet 1932. Lésions pulmonaires et spléniques identiques à celles du cobaye précédent ; ni chancre, ni abcès, ni adénite dans la région inoculée.

Ce même tableau clinique a été observé dans des cas étudiés par M. PERRAULT, F. COSTE et Robert BROCA.

Il faut donc admettre que l'inoculation au cobaye de sang contenant moins de 20 bacilles par cm³ est plus sensible que l'hémoculture préconisée par LOEWENSTEIN, comme le prouvent les expériences relatées ci-dessous, qui ont pour but de comparer les sensibilités respectives de ces deux méthodes.

Trois séries de cobayes ont été inoculées par voie intra-veineuse ou sous-cutanée avec une souche humaine « Ratti » cultivée sur pomme de terre glycérinée et âgée de 17 jours. Puis, à des délais variables, tous ces animaux ont été saignés à blanc, par ponction du cœur. Le sang de chaque animal, environ 12 à 14 cm³, rendu incoagulable par addition de 2 cm³ de citrate de soude, fut divisé en deux parties à l'aide d'une pipette graduée. On inocule une moitié (6 à

7 cm³), en parties égales, dans la cuisse de deux cobayes ; l'autre est traitée suivant la dernière méthode d'hémoculture préconisée par LOEWENSTEIN, etensemencée en totalité, à raison de 0,5 cm³ par tube, à la surface de plusieurs tubes de milieu de LOEWENSTEIN qui sont ensuite placés à l'étuve à 38°.

Les 18 cobayes du premier lot, qui avaient reçu 1 milligr. de l'émulsion bacillaire dans la veine du jarret, ont été sacrifiés après un délai variant de une heure à 15 jours. En effet, l'inoculation intraveineuse d'une telle dose de bacilles provoque l'amaigrissement rapide et la mort des animaux après 12 à 15 jours. A l'autopsie, on constate principalement une granulie aiguë et une énorme hypertrophie de la rate, qui est parsemée de granulations.

Le deuxième lot comprenait 18 cobayes inoculés avec 1/100^e de milligr. de bacilles par voie veineuse et qui, saignés dans les mêmes délais que les précédents, sont morts entre le 30^e et le 40^e jour avec des signes de tuberculose pulmonaire hématogène.

Enfin, un troisième lot de 12 cobayes fut inoculé par voie sous-cutanée avec un milligramme de bacilles.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau ci-joint.

PREMIÈRE SÉRIE. — *Cobayes inoculés par voie intraveineuse avec 1 milligramme de la souche humaine « Ratti ».*

Prélèvement du sang	1 h.	18 h.	40 h.	3 j.	4 j.
Culture.....	1 col.	30 col.	Innombrables	Innombrables	Innombrables
Inocul. (2 cobayes).	++	++	++	++	++

Prélèvement du sang	6 j.	8 j.	10 j.	13 j.	15 j.
Culture.....	Innombrables	1 col.	0	0	50 col.
Inocul. (2 cobayes).	++	++	++	++	++

DEUXIÈME SÉRIE. — *Cobayes inoculés par voie intra-veineuse avec 1/100 milligramme.*

Prélèvement du sang	1 h.	24 h.	2 j.	4 j.	6 j.	8 j.
Culture.....	0	0	0	6 col.	3 col.	2 col.
Inocul. (2 cobayes).	++	+ 0	+ 0	+ 0	+ 0	+ 0
Prélèvement du sang	11 j.	13 j.	15 j.	20 j.	29 j.	36 j.
Culture.....	2 col.	0	0	1 col.	0	0
Inocul. (2 cobayes).	++	++	0 0	++	0 0	0 0

TROISIÈME SÉRIE. — *Cobayes inoculés par voie sous-cutanée avec 1 milligramme.*

Prélèvement du sang	1 h.	24 h.	2 j.	4 j.	6 j.	8 j.
Culture.....	0	0	0	14 col.	0	1 col.
Inocul. (2 cobayes).	0 0	0 0	++	++	++	++
Prélèvement du sang	11 j.	13 j.	15 j.	20 j.	29 j.	36 j.
Culture.....	1 col.	0	0	0	0	0
Inocul. (2 cobayes).	+ 0	++	+ 0	0 0	0 0	0 0

Ce tableau montre que le sang des 10 cobayes de la première série, inoculés avec une dose massive, n'a fourni par la culture que 80 p. 100 de résultats positifs, tandis que l'inoculation au cobaye en a donné 100 p. 100.

On peut remarquer les fluctuations du nombre de colonies obtenues par hémoculture : très rares les premières heures qui suivent l'inoculation, elles deviennent innombrables dès le 6^e jour. Ce fait contraste avec l'évolution de

la tuberculose donnée par les mêmes échantillons de sang aux cobayes qui sont tous morts régulièrement en 3 ou 4 mois.

Les résultats sont encore plus nets chez les animaux du 2^e groupe : 45 p. 100 de résultats positifs par culture (5 sur 12) et 75 p. 100 par inoculation au cobaye (9 sur 12).

Enfin, chez les 12 animaux inoculés par voie sous-cutanée, la culture a fourni 3 résultats positifs et l'inoculation au cobaye, 7.

Il ressort de ces expériences que, chez les animaux infectés par voie veineuse ou sous-cutanée, la recherche de la bacillémie par l'inoculation au cobaye donne un pourcentage de résultats positifs de 20 à 35 p. 100 supérieur à celui fourni par la méthode d'hémoculture de LOEWENSTEIN.

Arrivé à la fin de ce travail, nous sommes en état de pouvoir donner les conclusions qui s'en dégagent, ainsi que le sens vers lequel nous devons désormais orienter nos recherches sur la bacillémie tuberculeuse ;

1^o Nos expériences, ainsi que celles de A. SAENZ et M. SADETTIN, montrent, sans aucun doute, que les craintes de LOEWENSTEIN, relatives à la prétendue action empêchante de l'hémoglobine sur la culture du bacille de Koch, ne sont pas justifiées.

2^o Malgré la supériorité du milieu de culture, du point de vue pratique, la méthode d'hémoculture de LOEWENSTEIN est moins sensible que l'inoculation au cobaye pour la mise en évidence de la bacillémie tuberculeuse expérimentale et dans la clinique humaine. Par ce dernier procédé, notre pourcentage de résultats positifs chez les malades atteints de formes diverses de tuberculose, s'est montré plus élevé que par l'hémoculture. Nous croyons que les traitements multiples que subit le sang dans cette méthode sont la cause de cet échec ; les laquages répétés, les lavages successifs et les centrifugations diminuent la quantité ou sont nuisibles à la conservation des éléments bacillaires qui,

d'après nos recherches, existent le plus souvent dans le sang à l'état de quelques unités.

3^o Nos recherches nous autorisent à affirmer que l'hémoculture et l'inoculation fournissent des résultats concordants lorsque le sang contient au moins 20 bacilles de Koch par cm^3 , mais à la condition d'ensemencer simplement sur milieu de LOEWENSTEIN le sang pur rendu incoagulable et laqué à l'eau distillée.

4^o Pour les sangs qui contiennent moins de 20 bacilles par cm^3 , l'inoculation immédiate au cobaye (sans dépasser la dose de 5 cm^3 par la voie sous-cutanée) est supérieure à la culture, mais il est nécessaire de prolonger l'observation pendant au moins 6 mois, et les résultats ne doivent être considérés comme négatifs que si les animaux ne réagissent pas à la tuberculine dans ces délais.

En employant cette méthode, nous avons décelé des paucibacillooses fugaces et transitoires dans le sang de malades allergiques atteints de rhumatisme chronique (A. SAENZ, F. COSTE et L. COSTIL), de maladie de Nicolas et Favre (A. SAENZ, M. PINARD, L. COSTIL, et A. FIEHRER), et d'érythème noueux (A. SAENZ, P. CHEVALLIER, M. LEVY-BRUHL et L. COSTIL).

C'est dans ce sens que nous devons orienter pour l'avenir nos recherches sur la bacillémie tuberculeuse.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les différentes questions traitées au cours de ce travail, peuvent être envisagées ainsi :

I. — AVANTAGES DE LA TECHNIQUE QUE NOUS PROPOSONS.

Une revue d'ensemble des méthodes employées pour établir le diagnostic bactériologique de la tuberculose nous ayant montré qu'il existait encore certaines manipulations qui compliquaient considérablement la culture du bacille de Koch, nous nous sommes proposé de la simplifier. En nous appuyant sur des expériences nombreuses et variées pour étudier les bases expérimentales de la méthode que A. SAENZ et nous-même avons préconisée, nous avons mis en relief qu'elle pouvait gagner en simplicité, sans rien perdre de sa précision et de sa sensibilité.

L'étude comparative de cette méthode et de celle de HORN considérée comme la plus sensible pour l'ensemencement des produits pathologiques, a révélé la supériorité de la technique que nous avons adoptée.

De même, nous avons montré expérimentalement l'avantage de l'emploi des milieux de culture à base d'œuf, d'asparagine, et de vert malachite pour l'isolement du bacille tuberculeux.

Le manque de sensibilité de l'examen direct et les sources d'erreurs auxquelles il peut donner lieu, limitent son application dans le diagnostic bactériologique de la tuberculose à certains cas bien déterminés.

II. — APPLICATIONS PRATIQUES.

a) *Produits pathologiques non infectés secondairement.* — L'application de la technique d'ensemencement adoptée par A. SAENZ et nous-même à l'étude bactériologique de produits pathologiques non infectés secondairement, et en particulier, de 80 liquides céphalo-rachidiens de méningite tuberculeuse, dont 42 (50 p. 100) négatifs à l'examen direct, nous a donné 100 p. 100 de résultats positifs.

D'un autre côté, dans 29 cas de méningite tuberculeuse dont les liquides céphalo-rachidiens ne montraient pas de bacilles à l'examen direct, le raclage des tubes ensemencés pour rechercher les bacilles acido-résistants avant l'apparition de toute colonie macroscopiquement visible, nous a permis d'établir un diagnostic précoce, 7 à 10 jours après l'ensemencement, et 10 à 12 jours avant que les cobayes inoculés simultanément se soient montrés sensibles à l'intra-dermo-réaction tuberculinique ou aient présenté une adénite inguinale suspecte.

Dans tous les cas où l'on soupçonne l'origine tuberculeuse d'une infection méningée, on peut donc se passer de l'inoculation au cobaye, même lorsque l'examen direct du culot de centrifugation n'a pas révélé la présence de bacilles acido-résistants.

Des recherches comparatives portant sur des épanchements séro-fibrineux de la plèvre, nous ont permis de déceler des bacilles de Koch par la culture dans 60 p. 100 des cas étudiés, tandis que l'inoculation au cobaye, n'a fourni que 30 p. 100 de cas positifs. Notre procédé appliqué à des épan-

chements pleuraux tuberculeux d'allure primitive s'est également révélé plus sensible que l'inoculation au cobaye (60 p. 100 de résultats positifs dans le premier cas, et 50 p. 100 dans le second). En outre, la culture a répondu plus rapidement que l'inoculation au cobaye.

b) *Produits pathologiques infectés secondairement.* — L'application de cette méthode au diagnostic bactériologique de 184 produits pathologiques secondairement infectés, dont 96 crachats, 57 sédiments urinaires, et 31 liquides de lavage d'estomac, nous a permis de faire les constatations suivantes.

Lorsque ces produits présentent des bacilles à l'examen direct, la culture et l'inoculation donnent 100 p. 100 de résultats positifs ; la culture suffit pratiquement et peut remplacer l'inoculation au cobaye.

La simplicité et la sensibilité de la culture, l'économie de frais et de temps qu'elle procure la rendent préférable quand il s'agit de produits contenant des bacilles à l'examen direct à toutes les autres méthodes de diagnostic bactériologique. En outre, l'emploi des milieux que nous avons préconisés permet de différencier par l'aspect des cultures, les types de bacilles tuberculeux humains et bovins.

Cependant, il est indispensable, pour les crachats, les sédiments urinaires ou les liquides de lavage d'estomac, négatifs à l'examen direct, de pratiquer simultanément la culture et l'inoculation au cobaye, car ces deux méthodes se complètent. Il arrive assez souvent pour des produits paucibacillaires, que les résultats donnés par la culture et l'inoculation soient discordants. En employant un seul de ces procédés on courrait donc le risque de poser un diagnostic inexact dans un cas positif.

La même technique employée pour l'ensemencement des tissus prélevés par biopsies chez des malades atteints d'affections diverses, nous a fourni des résultats qui concordaient avec l'inoculation au cobaye.

III. — RECHERCHES SUR LA BACILLÉMIE TUBERCULEUSE

a) *La bacillémie expérimentale.* — Dans la tuberculose expérimentale, la bacillémie est facilement décelable par l'inoculation au cobaye (A. BOQUET, et par la culture. L'ensemble de nos constatations, chez le cobaye, le lapin, et la souris, montrent que l'intensité et l'ampleur de la bacillémie expérimentale, qu'il s'agisse de bacilles mammifères ou de bacilles aviaires, dépendent de la dose et de la voie d'inoculation. Dans les conditions de nos expériences, chez les animaux inoculés avec des doses massives, la bacillémie a été décelée par culture quelques minutes après l'inoculation intrapéritonéale ou sous-cutanée. Elle dure de quelques heures à plusieurs jours, diminue ou même disparaît par la suite, et réapparaît dans la période terminale chez les animaux qui meurent de tuberculose évolutive.

b) *La bacillémie en clinique humaine.* — La méthode de LOEWENSTEIN.

Bases expérimentales :

Nos expériences sur la méthode de LOEWENSTEIN pour déceler la bacillémie tuberculeuse nous ont démontré que, contrairement à ce qu'a prétendu cet auteur, l'hémoglobine n'exerce aucune action empêchante sur le développement du bacille de Koch.

De plus, l'emploi de l'acide acétique comme agent hémolyasant préconisé dans la méthode primitive de LOEWENSTEIN permet la pullulation des bacilles paratuberculeux qui, dans une proportion de 50 p. 100, ont vicié les résultats de nos hémocultures.

Causes d'erreurs :

Nous avons mis en lumière les multiples causes d'erreurs qui peuvent survenir dans l'interprétation des microcolonies non repiquables recueillies par raclage des tubesensemencés

avec le sang. Contrairement à ce qu'admet LOEWENSTEIN, nous avons démontré que ces microcolonies sont le plus souvent constituées par des amas de cadavres de bacilles acido-résistants apportés par les liquides employés pour le traitement des produitsensemencés. Nous estimons donc qu'il ne faut tenir compte que des microcolonies cultivables et tuberculigènes.

Contrôles de la méthode de Loewenstein :

Les affirmations de LOEWENSTEIN relatives à la fréquence de la bacillémie, non seulement au cours de la tuberculose (de 50 à 100 p. 100), mais encore dans d'autres maladies nerveuses (50 p. 100) ou rhumatismales (70 p. 100), n'ont pas été confirmées par les nombreux travaux de contrôle qui aboutissent à des conclusions tout à fait opposées. Sur un total de 5.625 hémocultures effectuées par 62 auteurs, il n'a été constaté que 1 p. 100 seulement de résultats positifs.

Sur un total de 936 échantillons de sang dont il est question dans notre travail, ce qui représente 6.000 tubesensemencés, en suivant exactement les prescriptions de LOEWENSTEIN, nous n'avons obtenu que 12 cultures macroscopiques de bacilles de Koch, soit 1,2 p. 100. En ne faisant état que des hémocultures pratiquées chez les tuberculeux, les résultats positifs certains représentent un pourcentage de 1,58 ; dans la plupart des cas, la souche isolée était de type humain, et le petit nombre de colonies qui se sont développées montraient que la bacillémie se réduisait à une migration paucibacillaire.

Une enquête auprès des cliniciens qui avaient fourni les échantillons de sang qui ont donné un résultat positif, nous a montré que la plupart des cas positifs correspondaient à des primo-infections de l'enfant et de l'adolescent.

Les cultures de 37 sangs de rhumatisants aigus ou chroniques, de 83 sangs et de 60 liquides céphalo-rachidiens de déments précoces sont restées négatives.

L'écart considérable entre notre pourcentage de résultats positifs chez les tuberculeux et celui de LOEWENSTEIN, ainsi que notre échec complet chez les rhumatisants et chez les déments précoces, ne peut s'expliquer ni par des différences de sensibilité des milieux de culture, ni par des erreurs de technique, ni enfin par l'insuffisance de la collaboration entre la clinique et le laboratoire.

Nos résultats sont d'ailleurs identiques à ceux des experts (CALMETTE, et A. SAENZ, STANLEY-GRIFFITH, JENSEN, KOLLE, et KUSTER, UHLENHUTH et SEIFFERT) qui ont participé aux recherches de contrôle de la méthode de LOEWENSTEIN sous les auspices de la section d'Hygiène de la Société des Nations.

Caractères de la bacillémie en clinique humaine :

En résumé les faits qui précèdent montrent que la bacillémie dans l'infection tuberculeuse de l'homme présente les mêmes caractères que dans la tuberculose expérimentale des animaux : la dissémination bacillaire est précoce : elle se produit avant l'apparition de l'allergie, et de tout autre signe clinique ou radiologique de tuberculose.

Résultats :

C'est en s'inspirant de ces faits et de nos recherches sur l'hémoculture chez le chimpanzé (bacillémie initiale après absorption de B C G) que A. CALMETTE, B. WEILL-HALLE, A. SAENZ et nous-même avons réussi à démontrer l'absorption du bacille B C G chez le nouveau-né vacciné. Il nous a été possible de déceler la présence de ces bacilles-vaccins par hémoculture 4 à 6 heures après l'ingestion.

Par analogie, et comme le prouve un cas étudié par Robert DEBRÉ, A. SAENZ, et Robert BROCA, rien ne s'oppose à ce que dans la primo-infection du nourrisson, l'hémoculture puisse être positive dans la période anté-allergique.

D'après ces données, et faisant état des constatations expérimentales, Robert DEBRÉ, A. SAENZ, et Robert BROCA, chez 14 enfants ou nourrissons, atteints de tuberculose ini-

tiale, ont réussi dans 6 cas (un par hémoculture, 5 par inoculation au cobaye) à déceler un bacille type humain dans leur sang.

Ces recherches mettent en relief la notion de migration bacillaire au début de la tuberculose de l'enfance pendant que se constitue chez lui la lésion tuberculeuse initiale et que vire la réaction tuberculinique. Cette dispersion de quelques germes dans le sang circulant n'a aucune signification pour le pronostic ; elle est bien loin de laisser prévoir une localisation métastatique, et moins encore une évolution fâcheuse de la maladie.

D'ailleurs, dans leurs recherches sur la dispersion bacillaire chez les cadavres d'enfants ou de tuberculeux adultes, Robert DEBRÉ et M. PERRAULT arrivent à des constatations identiques aux précédentes : chez les tuberculeux adultes, la bacillémie tuberculeuse est exceptionnelle alors que dans la tuberculose de l'enfance elle est souvent fréquente, mais transitoire et de faible importance numérique.

Conclusions :

En ce qui concerne l'hémoculture, il ressort de notre travail que :

1^o Malgré la supériorité du milieu de LOEWENSTEIN, la méthode d'hémoculture est moins sensible que l'inoculation au cobaye pour la mise en évidence de la bacillémie tuberculeuse. Par l'inoculation au cobaye, notre pourcentage de résultats positifs chez des malades atteints de formes diverses de tuberculose, s'est montré plus élevé que par l'hémoculture. Nous estimons que les traitements multiples, qu'il s'agit de subir le sang dans cette méthode, sont la cause de cet échec ; les laquages répétés, les lavages successifs, et les centrifugations diminuent la quantité ou sont nuisibles à la conservation des éléments bacillaires qui existent le plus souvent à l'état de quelques unités.

2^o L'hémoculture et l'inoculation fournissent des résultats concordants lorsque le sang contient au moins 20 ba-

cilles de Koch par cm^3 , même quand on se contente d'ensemencer sur le milieu de LOEWENSTEIN le sang pur rendu incoagulable et laqué à l'eau distillée.

3^o Pour les sangs qui contiennent moins de 20 bacilles par cm^3 , l'inoculation sous-cutanée au cobaye est supérieure à la culture, mais il est nécessaire de prolonger l'observation pendant au moins trois mois, et de ne considérer les résultats comme négatifs que si les animaux ne réagissent pas à la tuberculine avant ce terme.

Vu : Le Président,
DEBRÉ

Vu : Le Doyen,
ROUSSY

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'académie de Paris,
CHARLÉTY

BIBLIOGRAPHIE

- ABT. — *Schweiz. Med. Woch.*, n° 45, 1931.
- ACCORIMBONI. — *Riv. di Patol. e Cli. della Tub.*, 1931, p. 221.
- D'ANTONA. — *Giorn. Batt. e Immun.*, 6, 1931, n° 6.
- ARLOING et DUFOURT. — *Bull. Acad. Méd.*, 110, 1933, p. 734.
- ARMAND-DELILLE et GAVOIS. — *Bull. Méd.*, 47, 1933, p. 147.
- ARMAND-DELILLE, LESTOCQUOY et VIBERT. — *Bull. Méd.*, 45, 1931, p. 235.
- *Presse Médicale*, 35, 1929, p. 504.
- *Acta ped.*, 13, 1932, p. 25.
- ARMAND-DELILLE et MANSEAU. — *Presse Médicale*, 38, 1922, p. 761.
- ARMAND-DELILLE et VIBERT. — *Presse Médicale*, 35, 1927, p. 402.
- *Amer. Journ. dis. child.*, 34, 1927, p. 547.
- *Bull. Acad. Med.*, 104, 1930, p. 732.
- *Paris Médical*, 79, 1931, p. 18.
- BACMEISTER et RUEBEN. — *Deut. Med. Woch.*, n° 50, décembre 1912.
- BARRMAN, BENEVOLENSKIJ et GOLDSTEIN. — *Sov. vac. Gaz.*, 1932, p. 906.
- BATTAGLINI. — *C. R. Soc. de Biol.*, 118, 1935, p. 305.
- BAUMANN. — *Beitr. Klin. Tbk.*, 79, 1932, p. 717.
- *Zeitsch. Kinderheilk.*, 53, 1932, p. 671.
- BECK. — *Deut. med. Woch.*, 1934, p. 644.
- BEERENS. — *C. R. Soc. de Biol.*, 108, 1933 p. 696.
- DE BENEDETTI et GALOTTI. — *Riv. Pat. e Clin. Tbk.*, 1932.
- LÉON BERNARD, DEBRE et BARON. — *Ann. de Med.*, 1, 1914, p. 217.
- BERNHARDT. — *Dermat. Wochr.*, 1933, p. 888.
- BERTHERAND. — *Thèse Méd. Paris*, 1899, p. 73.
- BERTRAND. — *Ann. de Med. Vet.*, 1927, p. 337.
- BESSAU. — *Med. Klin.*, 1932, p. 111.
- BESREDKA. — *Acad. des Sciences*, 156, 1913, p. 1633.
- *Ann. Inst. Pasteur*, 27, 1913, p. 1009.
- *Ann. Inst. Pasteur*, 28, 1914, p. 576.
- BEZANÇON et BUC. — *Presse Médicale*, 82, 1931, p. 1493.

- BEZANCON et GRIFFON. — *C. R. Soc. de Biol.*, **55**, 1903, p. 603.
— *C. R. Soc. de Biol.*, **55**, 1903, p. 259.
— *C. R. Soc. de Biol.*, **55**, 1903, p. 207.
BIANCHI. — *Boll. Soc. méd.-chir.*, Pavia, 1932.
BINGOLD et SPIER. — *Munch. Med. Woch.*, 1931, p. 1899.
BLECHMAN. — *C. R. Soc. de Biol.*, **96**, 1927, p. 1033.
BLUMENBERG. — *Med. Klin.*, 1929, p. 1136.
BOAS. — *Hosp. tid.*, 1933, p. 888.
BOER. — *Niederlandische Mi Heil.*, *Maandschr. Kindergeneesk*, **1**, 1932, p. 377.
BONINO. — *Boll. d. sezione Ital. d. Soc. Intern. di Microb.*, **4**, 1933.
— *XII^e Congrès Soc. Ital. Urilog.*, Pavia, 1933.
— *V^e Congrès nat. d. Microb.*, Cagliari, Milano, 1934.
— *Jour. Bact. Immun.*, **13**, n° 1, Torino, 1934.
BONNET et LEGROS. — *Ann. Méd.*, **34**, 1933, p. 315.
A. BOQUET. — *Ann. Inst. Pasteur*, **50**, 1933, p. 5.
— *C. R. Soc. de Biol.*, **109**, 1932, p. 1166.
— *C. R. Soc. de Biol.*, **117**, 1934, p. 662.
— *Encyclop. Méd.-chir.*, Paris, *Tuberculose*, chap. I, Le bacille de Koch.
A. BOQUET, A. SAENZ et L. COSTIL. — *C. R. Soc. de Biol.*, **116**, 1934, p. 517.
A. BOQUET et J. VALTIS. — *C. R. Soc. de Biol.*, **106**, 1931, p. 373.
A. BOQUET, J. VALTIS et A. SAENZ. — *Ann. Inst. Pasteur*, **46**, 1931, p. 373.
P. BOQUET. — *C. R. Soc. de Biol.*, **117**, 1934, p. 659.
BOSSAN et BAUDY. — *C. R. Soc. de Biol.*, **87**, 1922, p. 958.
BRECHMANN. — *Cent. für Bakt.*, **111**, 1929, p. 26.
BROCK. — *Beit. Klin. Tbk.*, **81**, 1932, p. 543.
BRUNI. — *Riv. Sanit. Siciliana*, **23**, n° 2, 1935.
BRUYNOGHE et ADANT. — *C. R. Soc. de Biol.*, **111**, 1932, p. 1056.
BRUZZONE BANFI. — *Zentr. Tbk.*, **38**, 1933, p. 506.
BUC. — *C. R. Soc. de Biol.*, **88**, 1923, p. 1135.
— *C. R. Soc. de Biol.*, **98**, 1928, p. 1495.
— *C. R. Soc. de Biol.*, **103**, 1930, p. 220.
BUSSON. — *Wien. Klin. Woch.*, **44**, 1931, p. 407.
— *Wien. Klin. Woch.*, **47**, 1934, p. 909.
A. CALMETTE. — *L'infection bacillaire et la tuberculose chez l'homme et les animaux*, 3^e édition, 1928. Masson, Paris.
A. CALMETTE, L. NÈGRE, et A. BOQUET. — *Manuel technique de Microbiologie et Sérologie*, 3^e édition, 1933. Masson, Paris.
A. CALMETTE, B. WEILL-HALLE, A. SAENZ et L. COSTIL. — *Bull. Acad. Méd.*, **32**, 1933, p. 110.
CAPALDI. — 1896. *Inf. bacill. et Tuberc.*, 3^e édit., 1928, p. 46.

- CASTELLI. — *Boll. Ist. Sierot. Milanese*, 1928, p. 633.
- CERQUA. — *Giorn. Batter.*, **11**, 1933, p. 1036.
- CHIARELLO. — *Rinascenza Medica*, **22**, 1927, p. 327.
- CHRISTOFFERSEN et FREDRIKSEN. — *Ugeskr. for Loege*, **93**, 1931, p. 587.
- CLAUSEN. — *Acta Tuberc. Scandinavia*, **5**, 1931, p. 379.
- COHN. — *Med. Klin.*, 1932, p. 111.
- *Journ. of Inf. Dis.*, **52**, 1933, p. 214.
- COLLIS et BROCKINGTON. — *Lancet*, **225**, 1933, p. 127.
- CORPER et DAMEROW. — *Amer. Rev. Tbc.*, **28**, 1933, p. 118.
- CORPER et UYEL. — *Amer. Rev. Tbc.*, **18**, 1927, p. 299.
- F. COSTE, J. FORESTIER, A. SAENZ et L. COSTIL — 3^e Cong. Rhumat., Paris 1933.
- F. COSTE et A. SAENZ — *Soc. Méd. Hôp. Paris*, **55**, 1931, p. 1842.
- F. COSTE, A. SAENZ et L. COSTIL — *Soc. Méd. Hôp. Paris*, **57**, 1933, p. 1203.
- *Soc. Méd. Hôp. Paris*, **57**, 1933, p. 1369.
- F. COSTE, J. VALTIS et F. VAN DEINSE — *Bull. Acad. Méd.*, **22**, 1933, p. 760.
- COURMONT. — *C. R. Soc. de Biol.*, **114**, 1933, p. 635.
- COWEN et HENDERSON. — *Amer. Rev. Tbc.*, **29**, 1934, p. 368.
- CRAMER et GIACOMI. — *Fortschr. d. Med.*, 1883, p. 145.
- CRIBBIN. — *Tubercle*, **14**, 1933, p. 163.
- CRUCHET et LEPAGE. — *Rev. mens. Mal. Enf.*, **23**, 1905, p. 544.
- R. DEBRE, A. SAENZ et R. BROCA. — *Soc. Méd. Hôp. Paris*, **18**, 1934, p. 771.
- *Wessens. Chaf. Woche in Frankfurt*, **111**, 1935, p. 39.
- VAN DEINSE. — *Ned. Maandschrift voor Geneesk*, 1928, p. 17.
- DETIS. — *Zeit. für Tuberk.*, **57**, 1932.
- DETTING. — *Munch. Med. Woch.*, 1932, p. 540.
- DESPEIGNES. — *C. R. Soc. de Biol.*, **84**, 1921, p. 182.
- *C. R. Soc. de Biol.*, **86**, 1922, p. 931.
- DIMITZA. — *Arch. für Klin. Chir.*, **150**, 1930, p. 646.
- DIMITZA et GÜSCHER. — *Munch., Med. Woch.*, 1932, p. 1917.
- DI NATALE. — *Giorn. di Batt. e Immun.*, **9**, n° 3, 1932, p. 476.
- DOBSZAY. — *Wschr. Kinderheilk*, **54**, 1932, p. 266.
- DOMINGO. — *C. R. Soc. de Biol.*, **108**, 1931, p. 619.
- DONGES. — *Zeitschr. f. Hyg.*, **75**, 1913, p. 185.
- DORPH-PETERSEN. — *Ugeskr. f. Loege*, **94**, 1932, p. 412.
- DORSET. — *Journ. of Amer. Med.*, 1902, p. 555.
- DREESEK. — *Med. Klin.*, 1913.
- EDERLE et KRILCH. — *Deut. Med. Woch.*, **58**, 1932, p. 7.
- EICHBAUM. — *Zeit. f. Immun. forch.*, **74**, 1932, p. 31.
- EISENDRATH. — *Thèse Méd. Paris*, 1933, Union des Journaux français, édit., Paris.

- EIZAGUIRRE et URALDE. — *Rev. Espan. Tuberc.*, **2**, 1931, p. 327.
- ELSAESSER. — *Beit. Zur Klin. der Tuberk.*, **26**, 1913, p. 4.
- EMSLIE. — *Edinburgh med. J.*, N. s., **41**, 1934, p. 141.
- ENGEL. — *Med. Klin.*, 1932, p. 252.
- FAVIA et FAUSTO. — *Polichin. Sez. med.*, 1933, p. 677.
- FETZER et SCHMIDT. — *Z. Tbk.forsch.*, **6**, 1934, p. 619.
- FISCHER. — *Zeitsch. f. Tuberk.*, **58**, 1930, p. 331.
- FISHER et URGOITI. — *Beit. Klin. Tuberk.*, **76**, 1931, p. 484.
- FREDERIKSEN. — *Med. Klin.*, 1934, p. 306.
- FRIEDLAENDER. — *Ugeskr. f. Loeget*, **92**, 1930, p. 156.
- FRONGIA. — *Giorn. di Batt. e Immun.*, 1927, p. 705.
- FUNK. — *Dermat. Wschr.*, 1933, p. 545.
- GIANNETTI. — *Boll. Ist. Sierot. Milanese*, 1931.
- GODSTEIN. — *Beit. z. Kin. der Tuberk.*, **28**, n° 2, 1913, p. 283.
- GOEBEL. — *Tuberkulose*, 1933, p. 54.
- GRAVILLON et FESTER. — *Rev. belge de Tuberc.*, **24**, 1933, p. 377.
- GRENET et ISAAC GEORGES. — *Soc. de Pédiatrie*, 1932, p. 499.
- GRIFFITH STANLEY. — *A system of bacteriology in relation to medicine*, vol. V, chap. iv, Bacillus tuberculosis.
- *Journ. of Pat. and Bact.*, **35**, 1932, p. 91 et 271.
- *Bull. Trim. Org. Hyg. S. D. N.*, 4, Ext. n° 2.
- GUALDI. — *C. R. Soc. de Biol.*, **112**, 1933, p. 956.
- GUERNON. — *Amer. Rev. of Tuberc.*, **30**, 1934, p. 510.
- HAGER. — *Med. Klin.*, 1932, p. 253.
- *Tuberkulose*, **39**, 1933.
- HAKN. — *Munch. Med. Woch.*, 1913, p. 345.
- HARMS. — *Tuberkulose*, **10**, 1932.
- HATRICK. — *Centrbl. Bakt.*, Refer, **92**, 1929, p. 115.
- *Centrbl. Bakt.*, Refer, **89**, 1928, p. 114.
- HAYMAKER, EKHART et FREUND. — *Journ. of Inf. Dis.*, **51**, 1932, p. 562.
- HERRMANN. — *Centr. f. Bakt.*, I. O., **102**, 1927, p. 169.
- VAN DER HOEDEN. — *Versl. der Tuberc. Studie comm.*, **5**, 1933, p. 56.
- HOHN. — *Centr. f. Bakt. I. O.*, **98**, 1926, p. 460.
- *Centr. f. Bakt. I. O.*, **103**, 1927, p. 342.
- *Centr. f. Bakt. I. O.*, **113**, 1929, p. 366.
- HUCK et KRAMER. — *Zeurschr. inf. Kraukh. Haustiere*, **33**, 1928, p. 77.
- VON HUTH et LIEBERTHAL. — *Surg. Gynec. et Obstr.*, **50**, 1930, p. 585.
- HUTTIG. — *Zeit. f. Tuberk.*, **62**, 1931, p. 35.
- ISAAC GEORGES. — *La Médecine*, n° 7, 1934, p. 374.
- IZARD et THIRY. — *Toulouse méd.*, **32**, n° 24, 1932.
- JACOBI. — *Klin. Woch.*, 1927, p. 2472.

- JENSEN. — *Ugeskr. f. Loeget*, **94**, 1932, p. 681.
— *Bull. Trim. Org. Hyg. S. D. N.*, 4, Ext., n° 2.
JENSEN et HUSTED. — *C. R. Soc. de Biol.*, **97**, 1927, p. 197.
JÉRUSALEM et URGOITI. — *Med. Klin.*, 1931, p. 679.
JONOFSON. — *Zeit. f. Tuberk.*, **61**, 1931, p. 35.
JOUY. — *Thèse Méd. Paris*, 1934, Doin édit., Paris.
KADISCH. — *Med. Klin.*, 1932, p. 111.
KALLOS. — *Munch. Med. Woch.*, 1931, p. 1901.
H. H. et E. KALBFLEISCH. — *Wein. Klin. Wschr.*, 1934, p. 939.
KARSTEN. — *Deutsche Tierarztl.*, 1928, p. 668.
KARWACKI. — *C. R. Soc. de Biol.*, **92**, 1925, p. 374.
KELEMEN. — *Orv. Hetil.*, 1933, p. 914.
KEMKES. — *Deutsche med. Woch.*, 1928, p. 1918.
KERESZTURI, HAUPTMANN, SCHICK et MISHULOW. — *Journ. Amer. med. Assoc.*, **100**, 1933, p. 1481.
KISSMEYER et LOEWENSTEIN. — *Munch. med. Woch.*, 1932, p. 626.
KNORR. — *Arch. Hyg.*, **108**, 1932, p. 181.
KNORR et FRIEDRICH. — *Munch. med. Woch.*, 1930, p. 173.
KOCH F. — *Deut. Med. Woch.*, 1932, p. 90.
— *Dermat. Z.*, **68**, 1933, p. 127.
KOCH R. — *Mitt. a. d. Kais. Gesundh.*, **2**, 1884.
KOLLE et KUSTER. — *Deut. Med. Woch.*, **70**, n° 9, 1934, p. 309.
KONRAD. — *Wien. Klin. Woch.*, **45**, 1932, p. 430.
KORTHOFF. — *Versl. Med. betr. Volks*, **19**, 1928, p. 1257.
KRAUSE. — *Centr. Tuberk.*, **54**, 1929, p. 227.
KREN. — *Wien Klin. Woch.*, 1931, p. 405.
KREN et LOEWENSTEIN. — *Wien. Klin. Woch.*, 1931, p. 743.
KRISTENSEN et JENSEN. — *C. R. Soc. de Biol.*, **90**, 1924, p. 45.
KUSTER et OLBRICH. — *Z. Tbk.*, **70**, 1934, p. 145.
LANG. — *Boll. Ist. Sierot. Milanese*, **7**, 1928, p. 285.
— *Med. Klin.*, 1932, p. 290.
LANGER. — *Kinderarztl. Prax.*, **3**, 1932, p. 353.
— *Med. Welt.*, **7**, 1933, p. 553.
LA BOURDELLES et HENRY. — *Arch. Inst. Pasteur Afrique du Nord*, 1922, p. 625.
LAURINISCH et ZAMBRANO. — *Pediatra*, **41**, n° 10, 1933.
LAYMON. — *Arch. of Dermat.*, **28**, 1931, p. 35.
LEGEZYNSKI et OSTROWSKI. — *C. R. Soc. de Biol.*, **111**, 1932, p. 1023.
LEURET et CAUSSIMON. — *Biol. Med.*, **25**, 1935, p. 1.
LEVIN. — *Mordiskt. Med. Tidskrift.*, 1932.
— *Acta Soc. Med. Suedoise*, **60**, 1934.

- LICHTENSTEIN. — *Munch. Med. Woch.*, 1928, p. 2096.
— *Munch. Med. Woch.*, 1931, p. 471.
- LIEBERMEISTER. — *Erg. Tbk. Forsch.*, **6**, 1934, p. 71.
- LIGNER. — *Zeitschr. für Kinderheilk.*, **50**, 1930, p. 505.
- LIMOUSIN. — *Ann. Inst. Pasteur*, **35**, 1922, p. 558.
- LOEWENSTEIN. — Sur la septicémie dans la tuberculose. *Zeits. f. Tuberk. u. Heilst.*, B7, H 6, 1905.
— *Zeits. f. Tuberk.*, 1925, p. 177.
— Importance clinique de la bacillémie tuberculeuse. *Presse Médicale*, n° 78, 1930, p. 1314, 2^e Congr. Intern. de Pédiatrie, Stockholm, 1930.
— Préparation du milieu de culture. *Deut. Med. woch.*, n° 24, 1930, p. 1010.
— Importance clinique de la bacillémie tuberculeuse. *Munch. Med. Woch.*, 1930, p. 1522 et 1662.
— Bacillémie au cours des différentes maladies. *Munch. Med. Woch.*, n° 7, 1931, p. 261, 263.
— Préparation du milieu de culture. *Zentr. f. Bakt.*, **120**, 1931, p. 127-128. *Klin. Woch.*, 1931, p. 976.
— Bacillémie tuberculeuse dans les affections du système nerveux central. *Munch. Med. Woch.*, n° 26, 1931, p. 1080-1082.
— La tuberculose en tant qu'infection générale. *Med. Klin.*, n° 46, 1931, p. 1669-1670.
— Remarques sur la bacillémie tuberculeuse. *Zeit. f. Tuberk.*, **64**, n°s 1 et 2, 1932, p. 120.
— Allergie et bacillémie. *Wien. Klin. Woch.*, n° 39, et 40, 1932, p. 1192.
— La bacillémie tuberculeuse vue par un bactériologiste. *Monde Médical*, 1933, p. 33.
— La bacillémie tuberculeuse au cours des maladies du système nerveux. *Wien. Med. Woch.*, n° 8, 1933, p. 228.
— Méthode de culture du bacille tuberculeux à partir du sang et signification clinique. *Med. Klin.*, n° 51, 1933, p. 1782.
— La bacillémie tuberculeuse et sa signification clinique. *Journ. Med. Lyon*, 20 octobre 1933.
— La méthode d'hémoculture du virus tuberculeux et ses résultats. *Ann. Inst. Pasteur*, **50**, 1933, p. 161.
— Remarques sur le travail de E. Kuster et S. Olbrich. *Zeit. f. Tuberk.*, **71**, Fasc. 2, 1934, p. 49.
— Contribution à l'étude de la bacillémie. Remarques sur le travail de Kolle et Kuster. *Deut. Med. Woch.*, n° 23, 1934, p. 871.
- LOEWENSTEIN, FANJUL et GERZNER. — Comparaison entre les résultats de la culture du bacille tuberculeux à partir du sang et ceux de la coloration directe du sédiment sanguin. *Med. Klin.*, **32**, 1932, p. 1106-1107.

- LOEWENSTEIN et RUSSEFF. — Hémoculture du bacille tuberculeux.
Wein. Klin. Woch., 1930, p. 10.
- LOEWY. — *Munch. med. Woch.*, 1928, p. 2096.
- LONG. — *Amer. Rev. of Tuberc.*, **9**, 1914, p. 215.
- LUBENAU. — *Hygien. Rundschau*, 1907, p. 1445.
- LUNDQUIST. — *Nord. Med. tidskr.*, **2**, 1930, p. 782.
- LYALL. — *Amer. Rev. of Tuberc.*, **5**, 1922, p. 899.
- MACH R. et S. — *C. R. Soc. de Biol.*, **109**, 1932, p. 722.
- MANCINI. — *Annali d'Igiene*, n^{os} 4 et 5, 1928.
- MANSEAU. — *Thèse Méd. Paris*, 1932, Jouve édit., Paris.
- MANTEUFEL. — *Med., Klin.*, 1932, p. 112.
- MATHIESEN. — *Deut. Med. Woch.*, **58**, 1932, p. 1069.
- MATTHIES. — *Central. f. Imr. Med.*, 1928, p. 782.
— *Klin. Woch.*, 1928, p. 351.
- MASSOL et BRETON. — *C. R. Soc. de Biol.*, **75**, 1913, p. 455.
- MEUNIER. — *Presse Médicale*, **6**, 1898, p. 81.
- MEYER. — *Med. Klin.*, 1932, p. 110 et 291.
- MIKULOWSKI. — *Arch. Méd. des Enfants*, **28**, 1925, p. 201.
- MOREAU. — *Rev. Tuberc.*, **3**, 1922, p. 381 et 385.
- MORELLE. — *Thèse Méd. Paris*, 1934, Arnette édit., Paris.
- MORQUIO. — *Rev. Sud-Amer. Méd. et Chir.*, **3**, 1932, p. 879.
— *Presse Médicale*, n^o 21, 1934, p. 409.
- MUNSTER-FRANK. — *Med. Klin.*, 1933, p. 1581.
- NANU, JONESCO et STEFANESCO. — *Presse Médicale*, n^o 98, 1931, p. 1805.
- NATTAN-LARRIER. — *Traité de microbiologie*, Doin édit., Paris, 1931.
- L. NÈGRE. — *C. R. Soc. de Biol.*, **95**, 1934, p. 283.
— *Encyclop. Méd.-Chir.*, Paris, Tuberculose, chap. VII, Réactions diagnostiques.
- NINNI et BRETEY. — *C. R. Soc. de Biol.*, **113**, 1933, p. 694.
- NINNI et DE SANCTIS MONALDI. — *C. R. Soc. de Biol.*, **113**, 1933, p. 37.
- NOBÉCOURT et DARRE. — *Soc. Et. Scient. sur la Tuberc.*, novembre 1912.
- NOCARD et ROUX. — *Ann. Inst. Pasteur*, **1**, 1887, p. 19.
- NORDWALL. — *Svensk, Lakardidn*, **29**, 1932, p. 17.
- NORTON THOMAS et BROOM. — *Zent. Bakt.*, **118**, 1930, p. 460.
- OEKONOMOPOULOU, PAPANIKOLAOU et JOANNIDES. — *Zeit. f. Tuberk.*, **63**, 1932, p. 340.
- OPITZ. — *Deut. Med. Woch.*, **54**, 1928, p. 2139.
— *Acta ped.*, **11**, 1930, p. 186.
— *Deut. Med. Woch.*, **56**, 1930, p. 1995.
— *Munch. Med. Woch.*, **78**, 1931, p. 949.
— *Beitr. Klin. Tbk.*, **82**, 1933, p. 298.

- OPITZ *Monatschr. Kinderheilk.*, **57**, 1933, p. 265.
- ORO. — *Policlinico*, 1931, p. 1207.
- ORZECZOWSKI. — *Centr. Bakt. I. O.*, **111**, 1929, p. 362.
- PAISSEAU et M^{me} LAQUERRIÈRE. — *Ann. Med.*, **37**, n° 2, 1935, p. 205.
- PALTAUF. — *Commun. alla Soc. di Med. Int. di Vienna, Med. Klin.*, 1932, p. 19.
- PARAF et ABAZA. — *Rev. crit. de Patho. et Therap.*, n° 6, 1932.
- PAWLOWSKY. — *Ann. Inst. Pasteur*, **2**, 1888, p. 303.
- PEARCE. — *Tuberkulose*, **13**, n° 12, 1932.
- PENKERT. — *Jahrb. Kinderheilk.*, **134**, 1932, p. 241.
- PERRAULT. — *Thèse Méd. Paris*, 1934, Legrand édit., Paris.
- PETRAGNANI. — *Bull. Ist. Sierot. Milanese*, fasc. 3, 1926 et 1928.
- PETROFF. — *Journ. of exper. Med.*, **22**, 1915, p. 38.
- PHILIPSON. — *Acta ped.*, **13**, 1932, p. 393.
- PIATKOWSKI. — *Deut. Med. Woch.*, **30**, 1904, p. 878.
- PICCIOLI. — *Giorn. Med. Mil.*, **80**, 1932, p. 979.
- PIETRONI et BUONOMINI. — *Riv. Pat. e Clin. Tbc.*, **7**, 1933, p. 33.
- POLLAK. — *Med. Klin.*, 1931, p. 1146.
- POPOFF et ROUSEFF. — *Bull. Soc. franç. Dermat.*, **39**, 1932, p. 955.
- POPPER. — *Deut. Med. Woch.*, 1932, p. 89.
- *Med. Klin.*, 1932, p. 290.
- *Klin. Wschr.*, 1933, p. 1650.
- *Wien. Klin. Wschr.*, n° 31, 1933, p. 969.
- POPPER, BODART et SCHINDLER. — *Wien. Klin. Woch.*, 1931, p. 1494.
- *Deut. Med. Woch.*, **58**, 1932, p. 31.
- POULSEN, JENSEN et HUSTED. — *Amer. Journ. dis. childr.*, **37**, 1929, p. 900.
- *Acta tbc. Scand.*, **4**, 1929, p. 359.
- *Amer. Journ. Dis. childr.*, **41**, 1931, p. 783.
- *Acta ped.*, **12**, 1932, p. 25.
- PROESKAUER et BECK. — *Zeit. f. Hyg.*, **128**, 1894, p. 18.
- PROSPERT. — *C. R. Soc. de Biol.*, **91**, 1924, p. 542.
- PULCHER. — *Arch. per le Scienze mediche*, 1927.
- RABINOWITSCH. — *Med. Klin.*, 1932, p. 113.
- RAFFO. — *Pathologica*, **3**, 1930, p. 499.
- RAVENEL et SCHMIDT. — *State Med. Soc. of Wisconsin*, 30 janvier, 2 juillet 1909.
- REITTER et LOEWENSTEIN. — *Wein. Klin. Woch.*, 1932, p. 293.
- RENC. — *Cass. lek. Ces.*, 1929, p. 316.
- RICHTER. — *Beil. Klin. d. Tuberk.*, **79**, 1932, p. 110.
- VAN RIEMSDIJK. — *Cent. für Bakt.*, **118**, 1930, p. 460.

RIST, ARMAND-DELILLE et LÉVY-BRUHL. — *Soc. d'Et. scient. sur la Tuberc.*, 1913.

RIST et JONESCO. — *Ann. de Méd.*, **26**, 1929, p. 301.

ROGUSKI. — *C. R. Soc. de Biol.*, **97**, 1927, p. 961.

ROLOFF. — *Zeitschr. Tuberk.*, **52**, 1928, p. 153.

RORDORF. — *Arch. Ostetr.*, **40**, 1933, p. 627.

ROSENBERGER. — *Munch. Med. Woch.*, 1913.

ROSETTI. — *Giorn. Batteriol.*, **11**, 1933, p. 209.

A. SAENZ. — Valeur diagnostique de l'hémoculture chez les tuberculeux. *C. R. Soc. de Biol.*, **107**, 1931, n° 26, p. 1455.

— Sur un bacille acido-résistant isolé du sang d'un malade par hémoculture. *C. R. Soc. de Biol.*, **107**, 1931, n° 26, p. 1457.

— Recherches sur la bacillémie tuberculeuse par la méthode de Loewenstein. *Presse médicale*, n° 59, 1932, p. 1161.

— *Rev. de la Tuberc.*, **13**, n° 5, 1932.

— Les méthodes de diagnostic bactériologique de la tuberculose et leur valeur clinique. *Rev. de Phthis.*, **14**, n° 1, 1933.

— Nouvelles recherches sur la bacillémie tuberculeuse. Leur signification clinique. *Presse médicale*, n° 97, 1933, p. 1960.

— Nouvelles études sur la bacillémie tuberculeuse (observations cliniques et recherches expérimentales), *Rev. Sud-Amér. de Méd. et de Chir.*, **5**, n° 1, 1934, p. 1-30.

— L'hémoculture du bacille de Koch par la méthode de Loewenstein. *La Médecine*, n° 7, 1932.

— Sur la présence fréquente de bacilles acido-résistants saprophytes dans le sang ensemencé par la méthode de Loewenstein. *C. R., Soc. de Biol.*, **62**, 1933, p. 434.

— Sur l'infection tuberculeuse spontanée du lapin et du cobaye. *C. R. Soc. de Biol.*, **109**, 1932, p. 437.

— Nuevos métodos de diagnostico bacteriologico de la tuberculosis y su significacion terapeutica, *Los progresos de la Clinica*, **40**, n° 9, 1933, p. 501. »

— Diagnostic bactériologique précoce de l'infection tuberculeuse par la recherche systématique de la « microculture ». *Paris-Médical*, **23**, n° 22, 1933, p. 503.

— Investigaciones sobre la bacilémia tuberculosa por el método de Loewenstein. *Bull. de l'Union Internationale contre la Tuberc.*, **10**, n° 3, 1933, p. 252.

— Diagnostico bacteriologico precoz de la infeccion tuberculosa por la investigacion sistematica de la microculture. *Prensa Médica*, n° 6, 1933, p. 14. La Habana, Cuba.

- Recherches sur la bacillémie tuberculeuse (Rapport) *Bull. de l'Union Internationale contre la Tuberc.*, **11**, n° 1, 1934, p. 31.
- Études sur la bacillémie tuberculeuse. Recherches expérimentales et cliniques. *Ann. Inst. Pasteur*, **52**, 1934, p. 645-691.
- A. SAENZ, P. CHEVALLIER, M. LÉVY-BRUHL et L. COSTIL. — Sur la présence du bacille de Koch virulent dans les lésions cutanées et dans le sang d'une malade en plein accès d'érythème noueux. *C. R. Soc. de Biol.*, **112**, 1933, p. 951.
- A. SAENZ, F. COSTE et L. COSTIL. — Sur l'extrême lenteur de l'évolution de la tuberculose chez les cobayes inoculés avec du sang ne contenant que quelques microbes. *C. R. Soc. de Biol.*, **111**, 1932, p. 934.
- A. SAENZ et L. COSTIL. — Importance de la microculture pour le diagnostic précoce de la méningite tuberculeuse par l'ensemencement direct du liquide céphalo-rachidien. *C. R. Soc. de Biol.*, **110**, 1932, p. 1189.
- Importance de la microculture pour le diagnostic précoce de la tuberculose pulmonaire par l'ensemencement des crachats. *C. R. Soc. de Biol.*, **111**, 1932, p. 770.
- Étude comparative des divers milieux à l'œuf pour l'isolement des bacilles tuberculeux. *C. R. Soc. de Biol.*, **112**, 1933, p. 1302.
- Sensibilité comparée des milieux de culture et de l'inoculation au cobaye pour l'isolement des bacilles tuberculeux. *C. R. Soc. de Biol.*, **113**, 1933, p. 50.
- Caractères de la bacillémie à bacilles aviaires chez la souris inoculée par voie péritonéale. *C. R. Soc. de Biol.*, **113**, 1933, p. 698.
- Procédés de recherche du bacille de Koch dans les diverses fractions des caillots sanguins extraits du cœur de sujets morts de tuberculose. *C. R. Soc. de Biol.*, **113**, 1933, p. 1135.
- Valeur et signification de la microculture non repiquable dans la recherche du bacille de Koch dans le sang. *C. R. Soc. de Biol.*, **115**, 1934, p. 257.
- Études comparatives des diverses méthodes de culture pour l'isolement du bacille de Koch. *C. R. Soc. de Biol.*, **115**, 1934, p. 584.
- Intérêt pratique de l'ensemencement direct du liquide céphalo-rachidien et de la recherche de la microculture pour le diagnostic précoce de la méningite tuberculeuse. *C. R. Soc. de Biol.*, **116**, 1934, p. 597.
- A. SAENZ, L. COSTIL et M. SADETTIN. — Étude de la toxicité comparée des solutions d'acide sulfurique et d'acide acétique pour le bacille de Koch. *C. R. Soc. de Biol.*, **115**, 1934, p. 1175.
- 12 souches appartenant à divers types de bacilles acido-résistants, isolées de l'organisme de cobayes neufs. *C. R. Soc. de Biol.*, **118**, 1935, p. 643.

- Étude des propriétés biologiques des souches de bacilles acido-résistants isolées de l'organisme de cobayes neufs. *C. R. Soc. de Biol.*, **118**, 1935, p. 645.
- Sensibilité comparée de la méthode de Loewenstein et de l'inoculation au cobaye pour la recherche de la bacillémie expérimentale. *C. R. Soc. de Biol.*, **118**, 1935, p. 1159.
- A. SAENZ et D. EISENDRATH. — La microculture du virus tuberculeux et son importance pour le diagnostic précoce de la tuberculose rénale par l'ensemencement des urines. *Ann. Inst. Pasteur*, **49**, n° 5, 1932, p. 608-613.
- La microculture et son importance dans le diagnostic précoce de la tuberculose rénale par l'ensemencement des urines. *Presse méd.*, n° 99, 1932, p. 1856.
- *C. R. Soc. de Biol.*, **109**, 1932, p. 1260.
- A. SAENZ et P. GUERRA. — Isolement d'un bacille du type aviaire des lésions et du sang d'un tuberculeux lupique. *C. R. Soc. de Biol.*, **108**, 1931, p. 715.
- A. SAENZ, J. M. LE MÉE et L. COSTIL. — Recherche du bacille tuberculeux dans les amygdales apparemment indemmes de toute lésion histologique spécifique chez les enfants et les adolescents. allergiques. *C. R. Soc. de Biol.*, **113**, 1933, p. 564.
- A. SAENZ et A. MANSEAU. — Importance de la culture de la moelle osseuse ou « myéloculture » pour le diagnostic de la tuberculose. *C. R. Soc. de Biol.*, **109**, 1932, p. 1115.
- A. SAENZ, J. M. DE MIGUEL et L. COSTIL. — Recherche comparative par la culture et l'inoculation au cobaye pour l'isolement du bacille de Koch dans les épanchements séro-fibrineux de la plèvre. *C. R. Soc. de Biol.*, **118**, 1935, p. 410.
- A. SAENZ, C. PASCAL, L. COSTIL et J. CHAPOULAUD. — Recherches sur la bacillémie tuberculeuse effectuée simultanément par la méthode de LOEWENSTEIN et par l'inoculation au cobaye chez des malades atteints de démence précoce. *C. R. Soc. de Biol.*, **115**, 1934, p. 1681.
- A. SAENZ, M. PINARD, L. COSTIL et A. FIEHRER. — Sur la présence du bacille de Koch dans le sang de sujets atteints de la maladie de Nicolas et Favre. *C. R. Soc. de Biol.*, **115**, 1934, p. 1597.
- A. SAENZ et M. SADETTIN. — Au sujet de l'action prétendue inhibitrice du sulfate de soude sur les cultures de bacilles tuberculeux. *C. R. Soc. de Biol.*, **113**, 1933, p. 245.
- Action du sang citraté de provenances diverses sur le développement en milieux liquides d'origine humaine, bovine ou aviaire. *C. R. Soc. de Biol.*, **116**, 1934, p. 1263.

- A. SAENZ, M. SADETTIN et L. COSTIL. — Etude de la toxicité comparée des solutions d'acide acétique et d'acide sulfurique pour le bacille aviaire et les bacilles paratuberculeux. *C. R. Soc. de Biol.*, **116**, 1934, p. 45.
- Différenciation des bacilles tuberculeux des mammifères, des bacilles paratuberculeux et des streptothricées révélées par l'étude de la toxicité comparée de l'acide sulfurique et de l'acide acétique. *C. R. Soc. de Biol.*, **118**, 1935, p. 215.
- A. SAENZ et Ch. TRUCHE. — Sur un cas de tuberculose spontanée chez le lapin. *Ann. Inst. Pasteur*, **47**, 1931, p. 472.
- A. SAENZ, Ch. TRUCHE et L. COSTIL. — Tuberculose spontanée chez un vison produite par un bacille bovin. *C. R. Soc. de Biol.*, **115**, 1934, p. 1478.
- SANCHEZ. — *Archiv. Inst. Nacion, de Higiene*, **2**, 1924.
- SAYE, SHELTON et ALSINA. — *Presse Médicale*, n° 8, 1934, p. 148.
- *Bull. Acad. Méd.*, **109**, 1933, p. 837.
- SCHLOSSMANN. — *Bull. Union intern. contre la Tuberc.*, **2**, n° 2, 1925, p. 3.
- SCHMIDT. — *Cent. f. Bakt.*, I. O., **101**, 1927, p. 364.
- SCHMIDT et SYLLA. — *Zeit. für Tuberk.*, **45**, 1926, p. 360.
- SCHRADER. — *Cent. f. Bakt.*, I. O., **102**, 1927, p. 163.
- SCHRAMEK. — *Beitr. Klin. Tbk.*, **82**, 1933, p. 606.
- SCHREINER. — *Wein. Klin. Woch.*, n° 15, 1932, p. 488.
- SCHWABACHER. — *Lancet*, 1931, p. 1130.
- SCHWARZ. — *Riv. Pat. e Clin. Tbc.*, 1932, p. 310.
- SCHYLLA. — *Monatschr. Kinderheilk.*, **58**, 1934, p. 219.
- SEELEMAN et KLINGMULLER. — *Cent. f. Bakt.*, I. O., **104**, 1927, p. 482.
- SEIFFERT. — *Deut. Med. Woch.*, n° 35, 1934, p. 1314.
- SERGEANT, DURANT, GASPARD et MARCOUX. — *C. R. Soc. de Biol.*, **111**, 1932, p. 980.
- SHAPIRO. — *Amer. Rev. of Tuberc.*, **26**, 1932, p. 418.
- *Zeit f. Tuberk.*, **66**, 1932, p. 248.
- SONNENSCHIEIN. — *Munch. Med. Woch.*, 1927, p. 154.
- SPENGLER. — *Zeitschr. f. Hyg.*, **42**, 1924, p. 90.
- STADLER. — *Med. Klin.*, 1933, p. 1582.
- STOKLIN. — *Acta Davos*, **1**, 1932, p. 4.
- STREMPER et BURKI. — *Schweiz. med. Wochschr.*, 1933, p. 1353.
- SUETTERLIN. — *Munch. Med. Woch.*, 1927, p. 154.
- SUMIJOSKI. — *Zeitschr. f. Tuberk.*, **49**, 1924, p. 333.
- SUQUE. — *Bol. Tecnico Direc. general de Sanidad*, Madrid, 1929, p. 5.
- SWEANY et EVANOFF. — *Amer. Rev. of Tuberc.*, **17**, 1928, p. 387.
- SWEANY, EVANOFF et GROSS. — *Amer. Rev. of Tuberc.*, **29**, 1934, p. 638.
- SZULE. — *Zeitschr. f. Tuberk.*, **61**, 1931, p. 422.
- *Beitr. Klin. Tbk.*, **82**, 1933, p. 717.

- TERZANI. — *Giorn. Clin. Med.*, **1**, 1930, p. 335.
- TIEDEMANN. — *Beit. Klin. d. Tuberk.*, **82**, 1933.
- TOPLEY et WILSON. — *The principles of Bacteriology and Immunity*, 2^e édition, Edward Arnold édit., Londres, 1931.
- TSETSU. — *C. R. Soc. de Biol.*, **87**, 1922, p. 22.
- UHLENHUTH. — *Deut. Klin. Woch.*, n° 27, 1908.
- UHLENHUTH et SEIFFERT. — *Deut. Med. Woch.*, n° 35, 1934, p. 1314.
- UHLENHUTH et XILENDER. — *Arbeit. aus d. k. Gesenheitsamt*, fasc. 1, 1909.
- ULMO. — *Bull. Soc. Franç. Dermat.*, **41**, 1934, p. 244.
- UNVERRICHT et DOSQUET. — *Zeit. f. Tuberk.*, **63**, 1932, p. 338.
- URBANÉK et MELLER. — *Zeit. f. Angenheilk.*, **77**, 1932, p. 17.
- VALTIS. — *Le Virus Tuberculeux*. Masson édit., Paris, 1933.
- VEBER. — *C. R. Soc. de Biol.*, **95**, 1926, p. 264.
- DE VERBIZIER. — *Soc. d'Et. scient. sur la Tuberc.*, n° 1, 1912.
- *Rev. de Méd.*, n° 3, 1913, p. 161.
- VERDINA. — *Riv. di Pat. e Clin. d. Tuberc.*, 1929, p. 190.
- WALLGREN. — *Amer. journ. dis. child.*, **41**, 1931, p. 816.
- *Kinderarzt. Prax.*, **2**, 1931, p. 485.
- *Kinderarzt. Prax.*, **3**, 1932, p. 268.
- WEATHERAIL. — *Lancet*, **222**, 1932, p. 980.
- WEBER et DRETERLEN. — *Tub. Art. a. d. Kaiserl. Geseudl.*, fasc. 12, 1912.
- WESSELEY et LOEWENSTEIN. — *Wien. Klin. Woch.*, n° 36, 1930, p. 827.
- WIESE. — *Beit. Klin. Tbk.*, **78**, 1931, p. 400.
- WILSON. — *Med. Res. Counc., Spec., rep.*, n° 82, 1933.
- WOLTERS. — *Deut. Tierar. Woch.*, **52**, 1928, p. 66.
- ZAPPA. — *Clin. e Igien. infant.*, **4**, 1929, p. 461.
- ZAPPÀ. — *Riforma med.*, 1933, p. 1198.
- ZEYLAND et PIASECKA ZEYLAND. — *Zeitschr. Tuberk.*, **67**, 1933, p. 188.
- ZIELER et HAMEL. — *Erg. Tbk.forsch.*, **6**, 1934, p. 435.
- ZOBOLI. — *Arch. Med. e Chir.*, **3**, n° 1, 1934, p. 41.

SAINT-AMAND (CHER). — IMPRIMERIE R. BUSSIÈRE. — 13-6-1935

